

Processamento de Agrião para recuperação de compostos bioactivos, com aplicação na indústria dos Nutracêuticos

Potencial Cosmecêutico

Catarina Isabel Ganhoteiro Maia

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Catarina Maria Martins Duarte, Ph.D., iBET/ITQB - UNL

Co-orientador: Margarida Gomes Moldão Martins, Ph.D., ISA – UL

Júri:

Presidente - Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais - Doutora Maria do Rosário Beja de Figueiredo Gonzaga Bronze, Professora Associada da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

- Doutora Catarina Maria Martins Duarte, Investigadora Auxiliar do Instituto de Biologia Experimental Tecnológica

Lisboa, 2014

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos que sabiam que era possível, aos que acreditaram e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Dra. Catarina Duarte por me ter dado a oportunidade de desenvolver o projecto no seu laboratório, Nutracêuticos e Libertação Controlada. Agradeço a orientação, a sabedoria transmitida, os conselhos e ideias, o apoio e o encorajamento durante os meses de desenvolvimento da tese.

À Dra. Teresa Serra e à Dra. Ana Matias, agradeço todo o auxílio e partilha de conhecimentos, bastante uteis para ultrapassar algumas barreiras com as quais me deparei.

Agradeço a todos os colegas de laboratório, por proporcionarem um óptimo ambiente de trabalho, e de forma especial:

À Cátia Carmo pela “porta” que me abriu, pela sua valiosa e indispensável ajuda em todas as fases do trabalho e pela constante motivação. À Joana Poejo pelo auxílio e transmissão de conhecimentos, nomeadamente nos ensaios de bioactividade e estudo de potencialidade para uso de extractos de agrião em cosmética. À Cristina Jimenez por todo o apoio e paciência na fase inicial do projecto. À Ana Nunes, à Inês Silva, ao Daniel Lopes, à Liliana Rodrigues, ao Agostinho Alexandre e ao Arturo Álvarez-Bautista, por todos os ensinamentos, companheirismo e por todos os momentos de boa disposição.

À Dra. Maria do Rosário Bronze, ao professor Luís Vilas Boas e às equipas dos grupos de Ciências Toxicológicas e Bromatológicas (Faculdade de Farmácia – Universidade de Lisboa) e de Química Analítica (ITQB), especialmente à Elsa Mecha e à Andreia Silva, agradeço todo o apoio na parte analítica do trabalho.

Aos meus “Marginais” que muitas vezes, mesmo sem terem noção, me ajudaram a superar as fases mais complicadas no decorrer destes meses. A vossa amizade e optimismo foram essenciais!

Por fim, mas definitivamente não menos importante, agradeço aos meus pais por nunca terem deixado de acreditar em mim, por nunca me terem deixado desistir e por tudo terem feito para me apoiar no decorrer do meu percurso académico. Não há palavras que descrevam o quão grata eu estou!

A todos, muito obrigada!

Resumo

O consumo de vegetais é reconhecidamente benéfico para a saúde humana. Actualmente, o aumento da preferência por produtos naturais traduz-se no interesse em recuperar e isolar os compostos bioactivos presentes na sua composição.

O objectivo desta tese consistiu no desenvolvimento de método de extracção para o agrião, recorrendo a metodologias “limpas”, para recuperação de compostos bioactivos com aplicação na indústria dos nutracêuticos. Inicialmente, a matriz agrião foi caracterizada fitoquimicamente, no seu conteúdo em polifenóis, terpenos e carotenóides. Um Desenho de Experiências com metodologia *Box-Behnken* foi utilizado para planear as extracções utilizando duas misturas água:co-solvente GRAS (água:etanol e água:propilenoglicol), variando a temperatura de extracção, a razão matriz:solvente e a razão água:co-solvente. Estes extractos foram analisados no que respeita ao seu teor em polifenóis, carotenóides e terpenos (métodos espectrofotométricos e cromatográficos), à sua actividade antioxidante e ao seu potencial cosmecêutico.

O extracto mais promissor, considerando-se o teor de polifenóis e a actividade antioxidante, foi PG 13. Em relação ao potencial cosmecêutico, os extractos TT/EtOH5 e H₂O7 revelaram-se mais favoráveis, nas acções anti-pigmentante e anti-rugas, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstraram que os extractos de agrião revelaram ser fontes de numerosos fitoquímicos, nomeadamente polifenóis e ácidos gordos, com actividade antioxidante, vantajosos para o desenvolvimento de produtos funcionais e com potencial para serem incluídos em cosmecêuticos.

Palavras-Chave: Agrião; Solventes GRAS; Composição Fitoquímica; Box-Behnken; Actividade Antioxidante; Cosmecêuticos.

Abstract

The consumption of vegetables is widely recognized to be beneficial to human health and this is mainly attributed to their high content in functional constituents.

The aim of this work was to develop a green extractin process of watercress for the recovery of bioactive compounds with application in the nutraceutical industry. Initially the matrix was characterized with respect to its content of polyphenols, terpenes and carotenoids. A Design of Experiments (DOE) was used to plan the extractions using two solutions water: co-solvent GRAS (water:ethanol and water:propylene glycol,) varying the extraction temperature, the ratio matrix:solvente and ratio water:cosolvent, in order to improve their content of polyphenols, carotenoids, and terpenes (spectrophotometric and chromatographic methods), their antioxidant activity and their cosmeceutical potential.

The most promising extract, considering the content of polyphenols and the antioxidant activity, was PG 13. Regarding the cosmeceutical potential, TT / EtOH5 have proved to be more auspicious for antipigmentation activity and H2O7 proved to be more favorable on anti-wrinkle assay. Watercress reveled to be a promising natural source of numerous phytochemicals, namely polyphenols, terpenes, isothiocyanates and fatty acids, rich in antioxidant activity, advantageous for the development of functional products and with potential to be included in cosmeceuticals.

Keywords: Watercress; GRAS Solvents; Phytochemical Composition; Box-Behnken Design; Antioxidant Activity; Cosmecuticals.

Extended Abstract

Plants and foods have been used for centuries for their medicinal properties, to prevent and treat all kind of diseases. The consumption of vegetables is widely recognized to be beneficial to human health and this is mainly attributed to their high content in functional constituents. Nowadays, the preference for natural products has increased, and with it, the interest in recover and isolate bioactive phytochemicals with potential health benefits.

The aim of this work was to develop a green extractin process of watercress for the recovery of bioactive compounds with application in the nutraceutical industry. To this end, it was important to study the phytochemical composition of watercress, namely polyphenols, carotenoids and terpenes, assess their antioxidant activity and investigate the cosmeceutical potential of the watercress extracts.

Initially the matrix was characterized with respect to its content of polyphenols, terpenes and carotenoids. A Design of Experiments (DOE) was used to plan the extractions. Moreover, it was decided to apply the three-level, three-factorial Box-Behnken experimental design, using two solutions water: co-solvent containing solvents GRAS [water: ethanol (EtOH) and water: propylene glycol (PG)] for the extraction of bioactive compounds from watercress. The extraction parameters [temperature (20-80 °C), ratio matrix:solvente (1:2-1:6) and ratio water:co-solvent 1:0-0:1)) were optimized by RSM in order to improve the responses, ie, total polyphenol content, total carotenoid content, total terpene content and antioxidant activity (ORAC, HORAC e HOSC assays). The statistical analysis was performed with the determination of both linear and quadratic effects of each factor under study, as well as their linear interactions. Their significance was evaluated by ANOVA. A three-dimensional surface, described by a second-order polynomial equation, was fitted to the experimental values. The goodness of fit of the model was evaluated by the determination coefficients (R²) and adjusted R² (R²_{adj}).

In general, the extracts from the DOE PG:H₂O presented the highest polyphenol contente and the highest antioxidant activity. Increasing the temperature within the range of values studied, resulting in an increase in most responses analyzed. it was concluded that the highest results were obtained with the extract PG 13 (T = 80 ° C with 20 mL of PG).

In order to validate the polynomial model fitted to the polyphenol content experimental data points, was carried out a extraction for each DOE, using the critical condition provided by the software. The results showed errors (2,42 % and 4,38 %) lower than 5% confirming the validation of the model within the experimental domain tested.

Furthermore, some selected extracts were analyzed by Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS), High-Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector – *Electrochemical Detection* (HPLC-DAD-ED) and Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS). The analysis by LC-MS was performed at extract EtOH 13 and extract H₂O 7 showed that watercress is a rich and complex matrix with a high content of caffeoyl malate, quercetin derivatives and canferol derivatives. HPLC-DAD-ED allowed the determination and identification of phenolic compounds present in the extracts analyzed. There were some differences in the composition of the extractsproving the

determinations performed by the Folin-Ciocalteu method, that extracts PG: H₂O have a higher content of polyphenols. On H₂O and DOE PG: H₂O extracts it was identified the presence of p-coumaric acid and ferulic acid. The bioactive (antioxidant) responses were correlated with the phytochemical composition of the extracts. The identification of volatiles on watercress and on the extracts was carried out by GC-MS. In the matrix it was possible to identify mostly alkanes, glucosinolates, with PEITC to stand out as the main component of the watercress, and some terpenes, including limonene and B-pinene. In the analysis of the extracts, the extract H₂O 6 predominated nitric compounds, such as pyridines and idoles. TT extract and EtOH extracts of 5:13 turned out to be quite similar, highlighting the presence of fatty acids and fatty acid esters. In extracts of PG, the solvent dominated the volatile composition of PG 5 and PG 13, hindering the identification of other chemical components.

Finally it was assessed the potential for application of the watercress extracts in the cosmetic industry. Enzyme inhibition assays were performed. Through the anti-tyrosinase activity is concluded that the extracts from EtOH, H₂O and MeOH had anti pigmentation activity, and the extract conducted to characterize the matrix (TT extract) inhibits 86% of the enzyme, followed by the EtOH 5 extract that revealed a percentage inhibition of 82,5. Extracts form the DOE PG: H₂O haven't shown the ability to inhibit tyrosinase. Inhibition of MMP-1 was performed to evaluate the anti-wrinkle activity. The H₂O 7 extract showed greater anti wrinkling potential with 64.5% inhibition of the enzyme. Through dermal absorption assay using a Franz cell, the absorption of the p-coumaric acid was followed for 24 hours. The MRM results showed that it wasn't possible the detection and quantification of p-coumaric acid in the samples.

Watercress reveled to be promising natural source of numerous phytochemicals, namely polyphenols, terpenes, isothiocyanates and fatty acids, rich in antioxidant activity, and with potential to be included in cosmeceuticals.

Keywords: Watercress; GRAS Solvents; Phytochemical Composition; Box-Behnken Design; Antioxidant Activity; Cosmecuticals.

Índice

1. Introdução Teórica	1
1.1. Vegetais – Dieta e Saúde.....	1
1.2. Brassicaceae	1
1.3. Agrião (<i>Nasturtium officinale</i> R. Br., Brassicaceae).....	3
1.3.1. Composição Química do Agrião - compostos bioativos mais relevantes.....	4
1.4. Bioactividade.....	9
1.4.1. Actividade Antioxidante	9
1.5. Nutracêuticos e Cosméticos.....	10
1.5.1. Acção anti-pigmentante.....	11
1.5.2. Acção anti-rugas.....	12
1.5.3. Absorção Cutânea	12
1.6. Extracção sólido-líquido de compostos bioativos	13
1.6.1. Extracções com EtOH	13
1.6.2. Extracções com PG	14
1.7. Objectivo e Estrutura da Tese	15
2. Materiais e Métodos	17
2.1. Reagentes	17
2.2. Matéria-Prima e sua Preparação.....	18
2.3. Extracções sólido-líquido para caracterização da matriz	18
2.3.1. Extracção para caracterização do agrião – Polifenóis Totais	18
2.3.2. Extracção para caracterização do agrião – Terpenos Totais	18
2.3.3. Extracção para caracterização do agrião – Carotenóides Totais	18
2.4. Desenho de Experiências – Optimização de Processo de Extracção.....	19
2.4.1. Tratamento estatístico	20
2.5. Caracterização dos Extractos	21
2.5.1. Método Espectrofotométrico para determinação de Polifenóis Totais.....	21
2.5.2. Método Espectrofotométrico para determinação de Terpenos Totais	21
2.5.3. Método Espectrofotométrico para determinação de Carotenóides Totais.....	21
2.5.4. Identificação e Quantificação de Componentes Químicos presentes nos extractos, por Cromatografia Líquida Alta Eficiência com Detector de Díodos e Detector Electroquímico (<i>High-Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector – Electrochemical Detection (HPLC-DAD-ED)</i>)	22
2.5.5. Identificação de Componentes Químicos presentes nos extractos, por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa (<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS)</i>)	22

2.5.6.	Identificação e Quantificação de Componentes Químicos presentes nos extractos, por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (GC-MS))	23
2.6.	Actividade Antioxidante	24
2.6.1.	Capacidade de Absorção dos Radicais de Oxigénio (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC</i>)	24
2.6.2.	Capacidade Antioxidante do Radical Hidroxilo (<i>Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity –HORAC</i>)	24
2.6.3.	Capacidade de Eliminação do Radical Hidroxilo (<i>Hydroxyl Radical Scavenging Capacity – HOSC</i>)	25
2.7.	Avaliação do potencial para aplicação em cosmética	25
2.7.1.	Ensaio Enzimáticos.....	25
2.7.2.	Estudo de Absorção Cutânea com a Célula de Franz.....	26
3.	Resultados e Discussão	27
3.1.	Caracterização da Matriz.....	28
3.2.	DOE EtOH:H2O	28
3.3.	DOE PG:H2O.....	35
3.4.	Caracterização Fitoquímica por Métodos Cromatográficos.....	42
3.4.1.	Cromatografia Líquida	42
3.4.2.	Cromatografia Gasosa	56
3.5.	Avaliação do potencial para aplicação em Cosmética	71
3.5.1.	Actividade enzimática	71
3.5.2.	Absorção cutânea	74
4.	Conclusão.....	77
5.	Referências Bibliográficas	79
6.	Anexos	87
	Anexo I - Cinética para determinação do tempo de extracção	87
	Anexo II – Design de Experiências (DOE).....	89
	Anexo III – Optimização do Método Espectrofotométrico para Determinação de Terpenos Totais.....	90
	Anexo IV – Determinação do Índices de Retenção	92

Lista de Tabelas

Tabelas	Nome	Pág.
1.1.	Exemplos de compostos bioativos, reportados para diferentes Brassicaceae	2
1.2.	Descrição Taxonómica do <i>Nasturtium officinale</i>	3
1.3.	Composição nutricional do Agrião	4
1.4.	Diferentes classes de compostos fenólicos	5
1.5.	Composição do agrião em compostos fenólicos	6
1.6.	Diferentes classes de terpenos	7
1.7.	Composição (% área) do óleo essencial obtido a partir de folhas e caules de agrião	8
1.8.	Concentração dos principais carotenóides presentes no agrião	9
1.9.	Aplicações cosméticas de extractos vegetais e suas acções	11
1.10.	Vantagem da utilização de Propilenoglicol, quer em formulações de novos produtos, quer como solvente extractor	14
2.1.	Variáveis estudadas nos DOE's H ₂ O: PG e H ₂ O: EtOH	19
2.2.	Identificação dos extractos e condições de extracção utilizadas	20
3.1.	Caracterização espectrofotométrica dos extractos realizados para qualificar a matriz, considerando os compostos-alvo em estudo	28
3.2.	Valores de Polifenóis Totais, Terpenos Totais, ORAC, HORAC e HOSC, determinados para o DOE EtOH:H ₂ O	29
3.3.	Efeitos Linear (L) e Quadrático (Q) e respectivos valores de significância (<i>p value</i>) dos factores estudados [temperatura (X ₁), razão matriz:solvente (X ₂) e razão água:co-solvente (X ₃)] e interacções sobre o teor de PT, TT, ORAC, HORAC e HOSC, para o DOE EtOH:H ₂ O	29
3.4.	Equações do modelo para as superfícies de resposta de PT, TT, ORAC, HORAC e em função dos factores estudados [temperatura (X ₁), razão matriz:solvente (X ₂) e razão água:co-solvente (X ₃)] e respectivos R ² and R _{ajust} ²	31
3.5.	Condições de temperatura (X ₁), razão matriz:solvente (X ₂) e razão água:co-solvente (X ₃) mais favoráveis definidas a partir da observação das superfícies de resposta ajustadas para o teor em PT, TT, ORAC, HORAC e HOSC (DOE EtOH:H ₂ O)	34
3.6.	Valores de Polifenóis Totais, Terpenos Totais, ORAC, HORAC e HOSC, determinados para o DOE PG:H ₂ O	35
3.7.	Efeitos Linear (L) e Quadrático (Q) e respectivos valores de significância (<i>p value</i>) das variáveis testadas [factores: temperatura (X ₁), razão matriz:solvente (X ₂) e razão água:co-solvente (X ₃)] e interacções sobre o teor de PT, ORAC, HORAC e HOSC, para o DOE PG:H ₂ O	36
3.8.	Equações do modelo para as superfícies de resposta de PT, ORAC, HORAC e em função das variáveis testadas [factores: temperatura (X ₁), razão matriz:solvente (X ₂) e razão água:co-solvente (X ₃)] e respectivos R ² and R _{ajust} ²	37

3.9.	Condições de temperatura (X_1), razão matriz:solvente (X_2) e razão água:co-solvente (X_3) mais favoráveis, definidas a partir da observação das superfícies de resposta ajustadas para o teor em PT, TT, ORAC, HORAC e HOSC (DOE PG:H ₂ O)	39
3.10.	Valores críticos (condições óptimas) determinados pelo <i>software</i> e previsão do valor de PT no extracto elaborado nessas condições	41
3.11.	Valores de PT óptimos para os DOE's EtOH:H ₂ O e PGH:H ₂ O, e respectivos valores de ORAC	41
3.12.	Erro associado à determinação de Polifenóis Totais – valor previsto pelo modelo vs. valor determinado experimentalmente	42
3.13.	Quantificação de Polifenóis Totais, Ácido Fenólicos Totais e Flavonóides Totais, por integração das áreas dos picos dos cromatogramas a 280, 320 e 360 nm	45
3.14.	Quantificação da Actividade Antioxidante ($\mu\text{mol ET/g m.f.}$), por integração das áreas de cada um dos picos assinalados com * na figura 3.7. e através da soma das áreas dos três picos.	48
3.15.	Identificação de compostos de EtOH 13, por espectrometria de massa	53
3.16.	Identificação dos Índices de Retenção e dos Tempos de Retenção da mistura de alcanos (padrão)	56
3.17.	Identificação dos compostos voláteis do Agrião determinados por análise GC-MS	59
3.18.	Identificação dos compostos voláteis do extracto TT determinados por análise GC-MS	61
3.19.	Identificação dos compostos voláteis do extracto H ₂ O 6 determinados por análise GC-MS	63
3.20.	Identificação dos compostos voláteis dos extractos EtOH 5 e EtOH 13 determinados por análise GC-MS	65
3.21.	Identificação da % área relativa dos picos de PG vs. outros compostos voláteis dos extractos PG 5 e PG 13 determinados por análise GC-MS	69
3.22.	Identificação dos compostos voláteis dos extractos PG 5 e PG 13 determinados por análise GC-MS	69
3.23.	Valores de % de inibição da tirosinase para os diferentes extractos testados	72
3.24.	Valores de % de inibição da MMP-1 para os extractos testados	73

Lista de Figuras

Figuras	Nome	Pág.
1.1.	Relação entre os genomas das espécies do género <i>Brássica</i>	1
1.2.	Aspecto morfológico do Agrião (<i>Nasturtium officinale</i>)	3
1.3.	Representação de uma célula de Franz (estática)	13
1.4.	Esquematização da estrutura da Tese	15
3.1.	Solução final após reacção do PG com 2% vanilina:H ₂ SO ₄	27
3.2.	Superfícies de Resposta (DOE EtOH:H ₂ O) ajustadas para o teor em Polifenóis Totais (i.), o teor em Terpenos Totais (ii.) e a actividade antioxidante pelos métodos ORAC (iii.), HORAC (iv.) e HOSC (v.), em função das 2 combinações a) e b) de respostas mais favoráveis	32
3.3.	Superfícies de Resposta (DOE PG:H ₂ O) ajustadas para o teor em Polifenóis Totais (i) e a actividade antioxidante pelos métodos ORAC (ii.), HORAC (iii.) e HOSC (iv.), em função das 2 combinações a) e b) de respostas mais favoráveis	38
3.4.	Sobreposição dos perfis cromatográficos dos extractos de agrião (PG:H ₂ O 15, PG 14, PG 13, PG:H ₂ O 10, PG:H ₂ O 9, PT, H ₂ O 7, EtOH:H ₂ O 15, EtOH 14, EtOH 13, EtOH:H ₂ O 10, EtOH:H ₂ O 9) preparados com EtOH, H ₂ O, MeOH e Propilenoglicol (PG), a 280nm	43
3.5.	Sobreposição dos perfis cromatográficos dos extractos de agrião (PG:H ₂ O 15, PG 14, PG 13, PG:H ₂ O 10, PG:H ₂ O 9, PT, H ₂ O 7, EtOH:H ₂ O 15, EtOH 14, EtOH 13, EtOH:H ₂ O 10, EtOH:H ₂ O 9) preparados com EtOH, H ₂ O, MeOH e Propilenoglicol (PG), a 320 nm (i) e 360 nm (ii)	44
3.6.	Comparação dos perfis cromatográficos do extracto de PG, com os das misturas HPLC (1. Ácido gálico; 2. 5-HMF; 3. Ácido protocatechuico; 4. Ácido p-hidroxibenzóico; 5. Catequina; 6. Ácido cafeico; 7. Siringaldeido; 8. Ácido ferúlico; 9. Ácido salicílico; 10. Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico), mistura 2 (11. Ácido siringico; 12. Luteolina-7-glucósido; 13. Canferol-3-glucósido; 14. Canferol; 15. Quercetina) e mistura 1 (16. Ácido clorogénico; 17. Ácido p-cumárico; 18. Rutina; 19. Apigenina-7-glucósido; 20. Apigenina; 21. Isoramentina) a 280nm	46
3.7.	Comparação dos perfis cromatográficos dos extractos de agrião, obtidos no Electroquímico (ED) [i. extractos de EtOH, MeOH (ExtPT) e H ₂ O (H ₂ O 7) ii. extractos de PG]	47
3.8.	Cromatograma LC-MS do extracto EtOH 13, a 280 (i.), 320 (ii.) e 360 (iii.) nm	50
3.9.	Cromatograma a 280 nm (i.) e MS Scan (ii.) de EtOH 13	51
3.10.	Cromatogramas do extracto EtOH 13 após hidrólise ácida a 280, 320 e 360 nm	52
3.11.	Cromatograma GC-MS da análise realizada com as misturas de alcanos padrão a) mistura de alcanos C8 – C20 b) mistura de alcanos C10 – C40	57
3.12.	Cromatograma GC-MS da análise realizada com fibra (SPME Fiber Assembly, 50/30 µm DVB/ CAR/ PDMS, Stableflex (2cm)) ao agrião a) zoom 0 - 22 min b) zoom 22 – 40 min	56

3.13.	Cromatograma GC-MS da análise ao extracto TT a) <i>zoom</i> 0 – 36 min	62
3.14.	Cromatograma GC-MS da análise ao extracto H ₂ O 6	64
3.15.	Cromatogramas GC-MS das análises aos extractos EtOH 5 (I) e EtOH 13 (II)	67
3.16.	Cromatogramas GC-MS das análises aos extractos PG 5 (I) e PG 13 (II)	70
3.17	Cromatograma MRM do padrão ácido p-cumárico (1 ppm)	74
3.18	Cromatogramas MRM do extracto H ₂ O 7, 24h, 8h, 7h, 6h, 5h, 4h, 3h, 2h, 1h e branco	74

Lista de Abreviaturas

Abreviatura Significado

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AU	Unidades de Absorvância (<i>Absorbance Units</i>)
BBD	Desenho Box-Behnken (<i>Box-Behnken Design</i>)
BSA	Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CT	Carotenóides Totais
D.C.	Depois de Cristo
DOE	Desenho de Experiências (<i>Design of Experiments</i>)
dp	Desvio Padrão
DPPH	Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>)
e.s.	Extracto Seco
EAC	Equivalentes de Ácido Cafeíco
EAF	Equivalentes de Ácido Ferúlico
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
ECETOC	Centro Europeu de Ecotoxicologia e de Toxicologia das Substâncias Químicas (<i>European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals</i>)
ED	Detector Electroquímico (<i>Electrochemical Detector</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
EL	Equivalentes de Linalool
EQ	Equivalentes de Quercetina
ET	Equivalentes de Trolox
EtOH	Etanol
Ext	Extracto
Eβ-c	Equivalentes de β-caroteno
FAEE	Ésteres Etilícos de Ácido Gordos (<i>Fatty Acids Ethyl Esteres</i>)
FAME	Ésteres Metílicos de Ácido Gordos (<i>Fatty Acids Methyl Esteres</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Fármacos dos Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FL	Fluoresceína
FRAP	Poder Antioxidante por Redução do Ferro (<i>Ferric Reducing Ability of Plasma</i>)
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro (<i>Generally Recognized As Safe</i>)
HORAC	Capacidade Antioxidante do Radical Hidroxilo (<i>Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity</i>)
HOSC	Capacidade de Eliminação do Radical Hidroxilo (<i>Hydroxyl Radical Scavenging Capacity</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (<i>High-performance Liquid Chromatography</i>)

HPLC-	Cromatografia Líquida Alta Eficiência com Detector de Díodos e Detector
DAD-EC	Electroquímico (<i>High-Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector – Electrochemical Detection</i>)
ID	Identificação
INCI	Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos (<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredient</i>)
IR	Índice de Retenção
IS	Índice de Semelhança
L	Linear
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
L.D.	Limite de Detecção
L-DOPA	Levodopa
L.Q.	Limite de Quantificação
m.f.	Massa Fresca
m.s.	Massa Seca
MeOH	Metanol
MMP-1	Metaloproteinase 1
MMP's	Metaloproteinases
MRM	Monitorização de Reacções Múltiplas
MS	Espectrometria de Massa (<i>Mass Spectrometry</i>)
nd	Não Determinado
n.i.	Não Identificado
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>)
ORAC	Capacidade de Absorção dos Radicais de Oxigénio (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)
PBS	Tampão Fosfato (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PEITC	2-Feniletil Isotiocianato
PG	Propilenoglicol
PT	Polifenóis Totais
Q	Quadrático
ROS	Espécies Reactivas de Oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RSM	Método da Superfície de Resposta (<i>Response Surface Methodology</i>)
SPB	Tampão Fosfato de Sódio (<i>Sodium Buffer Saline</i>)
TIMP	Inibidor Endógeno de Metaloproteinases (<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>)
tR	Tempo de Retenção
TT	Terpenos Totais
TYR	Tirosinase
UE	União Europeia

USDA	Departamento da Agricultura dos Estados Unidos da América (<i>United States Department of Agriculture</i>)
UV	Ultra-violeta
v/v	volume/volume

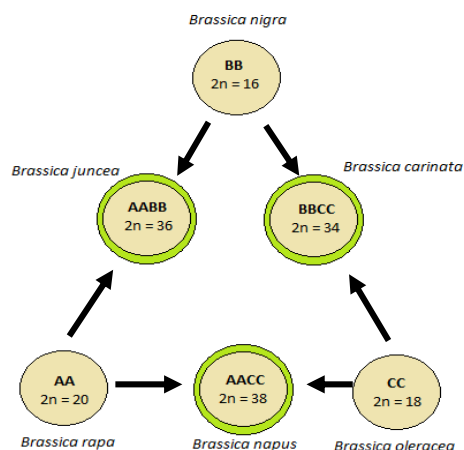
1. Introdução Teórica

1.1. Vegetais – Dieta e Saúde

Os vegetais são extremamente importantes na dieta humana e são uma das maiores fontes de substâncias biologicamente activas. A composição nutricional dos vegetais é bastante complexa e pode ser dividida em duas classes de metabolitos: os primários e os secundários (Hounsome et al. 2008). O nível de metabolitos constituintes dos vegetais é fortemente afectado por factores genéticos e ambientais, tais como a variedade, a luz, o solo, o clima, a aplicação de produtos fitossanitários, a presença de patogénicos, o *stress* oxidativo, e ainda pelas condições de transporte e armazenagem (Orcutt & Nielsen 2000 e Kalt 2005). A acção destes factores pode resultar na perda de compostos benéficos para a saúde humana.

1.2. Brassicaceae

A família de hortícolas *Brassicaceae* (*Cruciferae*), vulgarmente denominada de Brássicas ou Crucíferas, é composta por 350 géneros e aproximadamente 3500 espécies (Sasaki et al. 2002). Inclui muitos vegetais comuns, como os brócolos, couve-flor, agriões, couves, couves-de-bruxelas, rabanetes e alguns condimentos (mostardas). Entre as culturas que possuem importância comercial, existem diversas variedades englobadas em seis espécies do género *Brassica*. Na figura 1.1., observam-se as relações evolutivas entre os genomas, que são descritas pela teoria do triângulo.



Legenda: 2n – número de cromossomas diplóides

Figura 1.1. – Relação entre os genomas das espécies do género *Brássica* (adaptada de Sousa 2009)

Esta teoria assenta na ideia que a combinação dos três genomas apresentados originou vegetais e oleaginosas, que fazem parte da dieta humana. Deste modo verifica-se que as três espécies ancestrais, *Brassica rapa* (por exemplo, couve chinesa e nabo), *Brassica nigra* (mostarda preta) e *Brassica Olerácea* (como é o caso dos brócolos e da couve-flor), AA, BB e CC respectivamente, relacionam-se e do seu cruzamento derivam os híbridos *Brassica juncea* (mostarda da Índia, mostarda chinesa ou mostarda castanha), *Brassica napus* (nabiça ou colza) e *Brassica carinata* (mostarda da Etiópia) (Sousa 2009).

As brássicas são consumidas um pouco por todo o mundo. Não são apenas referenciadas pelo seu conteúdo rico em proteínas para humanos e animais, mas também são reconhecidas como uma ótima fonte de outros nutrientes, como vitaminas (carotenóides, tocoferol, ácido ascórbico, ácido fólico), minerais (Ca, Zn, P, Mg, etc.), hidratos de carbono (sacarose e glucose), aminoácidos (por exemplo, ácido L-aspártico, ácido L-glutâmico, L-glutamina e L-histidina) e diferentes fitoquímicos, como é o caso dos compostos fenólicos (ácidos ferúlico, hidroxibenzóico, clorogénico, cafeico, p-cumárico e sinápico, antocianinas, quercetina e canferol) e dos glucosinolatos (principalmente glucoiberina, glucorafanina, glucoalissina, gluconapina, glucobrassicina e gluconasturtina). Todos os fitoquímicos enunciados, e discriminados na tabela 1.1., contribuem para as actividades antioxidante, anticancerígena e acção de protecção cardiovascular, reportadas em diversos estudos (Jahangir et al. 2009).

Tabela 1.1. Exemplos de compostos bioativos, reportados para diferentes Brassicaceae

Brassicaceae	Compostos Bioativos	Ref
Brócolos	esteróis, ácidos gordos, ácido ascórbico, clorofila a e b, luteína, β -caroteno, canferol-3-O-glucósido, canferol-3-O-soforósido, quercitina-3-O-glucósido, quercitina-3-O-soforósido, isoquercetina, derivados de ácido sináptico e ferúlico, glucorafanina, glucobrassicina	(Vallejo et al. 2002), (Podsędek 2007) e (Ares et al. 2013)
Couve-Flor	ácido ascórbico, ácido fólico, β -caroteno, antoxantinas, antocianinas, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, ácido sinápico, γ -tocopherol, glucorafanina, sinigrina	(Hounsome et al. 2008) e (Ahmed & Ali 2013)
Rúcula	ácido ascórbico, β -caroteno, luteína, quercetina e derivados, Isoramentina e derivados, taninos, terpenos	(Uchbauer 2002), (Martínez-Sánchez et al. 2008) e (Durazzo et al. 2013)
Couves-de-Bruxelas	α -caroteno, β -caroteno, ácido oxálico, riboflavina, frutose, arginina, isoleucina, lignanas, esteróis, glucorafanina, glucoalissina, gluconapina	(Hounsome et al. 2008)
Couve-Tronchuda	ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido pirúvico, sinapoliglucose e isómeros, canferol e derivados, quercetina e derivados, clorofila a e b, β -caroteno	(Sousa 2009)
Mostarda	carotenóides, glucosinolatos e índoles, canferol e derivados, quercetina e derivados, derivados de ácido ferúlico, p-cumárico, cafeico, málico e sináptico	(Duyn 2000) e (Lin & Harnly 2013)
Nabo	ácido cafeico, ferúlico, sináptico, cítrico, aconítico, málico, ketoglutarico e fumárico, canferol e derivados, isoramentina	(Fernandes et al. 2007)

Para além dos géneros apresentados, existe ainda um sétimo género da família *Brassicaceae*, que gerou alguma controvérsia aquando da sua definição. O uso de dados moleculares, juntamente com a avaliação crítica da morfologia, auxiliou na resolução de conflitos entre as hipóteses sobre os limites e as relações de géneros das brássicas. *Nasturtium*, que é muitas vezes denominado pelo sinónimo de *Rorippa*,

é reconhecido como um género distinto constituído por cinco espécies, entre as quais o agrião (Al-shehbaz & Price 1998).

1.3. Agrião (*Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae)

O agrião pertence à família das *Brassicaceae*, classificação taxonómica atribuída pelo sistema de Cronquist, em 1988 e que veio substituir a denominação *Cruciferae* conferida pelo sistema de Engler, em trabalhos publicados entre os anos de 1892 – 1964 (Arbos 2004 e Smith 2007). O restante enquadramento taxonómico, outorgado pelos dois cientistas pode ser consultado na tabela 1.2..

Tabela 1.2. – Descrição Taxonómica do *Nasturtium officinale* (adaptada de Carvalho 2001)

	Engler	Cronquist
Divisão	Angiospermae	Magnoliophyta
Classe	Dicotiledónea	Magnoliopsida
Subclasse	Archichamydeae	Dilleniidae
Ordem	Papaverales	Capparales
Família	Cruciferae	Brassicaceae
Género	<i>Nasturtium</i>	<i>Nasturtium</i>
Espécie	<i>Nasturtium officinale</i>	<i>Nasturtium officinale</i>

A história documenta o uso de agrião como planta medicinal desde o primeiro século D.C.. Além da sua utilização como planta medicinal, o agrião tem sido usado como alimento desde a Era Clássica, acreditando-se que seja um dos dois mais antigos vegetais verdes a serem consumidos por humanos. Repleto de mais de 15 vitaminas e minerais essenciais, fisicamente apresenta-se como sendo uma planta pequena, perene que pode atingir aproximadamente 80 cm de altura; o seu caule tenro pode ter coloração verde ou arroxeada e as suas folhas possuem forma alternando entre o oval e o redondo, com tonalidade verde escura (figura 1.2.) O agrião comercial é cultivado a partir de sementes e floresce normalmente duas vezes por ano (Abril/ Maio e Novembro/ Fevereiro). O facto de ser um produto com um tempo de prateleira diminuto torna necessário que o seu transporte e comercialização sejam efectuados num curto período de tempo (Smith 2007).



Figura 1.2. – Aspecto morfológico do Agrião (*Nasturtium officinale*)

1.3.1. Composição Química do Agrião - compostos bioativos mais relevantes

Tal como referido anteriormente, diferentes vegetais têm sido utilizados durante séculos devido às suas propriedades medicinais, não havendo dúvida de que as ervas e as plantas são as drogas mais antigas do mundo (Kaliora et al. 2014). Todas as espécies vegetais possuem a capacidade de produzir diversos compostos orgânicos, que têm um papel essencial no seu funcionamento e evolução. Os metabolitos primários caracterizam-se por estarem envolvidos no desenvolvimento e crescimento celular, na respiração e fotossíntese, e na síntese proteica e hormonal (Hounscome et al. 2008). Estes incluem os hidratos de carbono (monossacáridos, dissacáridos, oligossacáridos e polissacáridos); os aminoácidos constituintes das proteínas e que podem ser encontrados com diferentes concentrações em vários vegetais; as vitaminas do complexo B existentes em quantidades consideráveis nos agriões (Santos et al. 2012); os ácidos orgânicos (ácidos cítrico, málico, fumárico, acético, oxálico, sucínico, tartárico, quínico, etc.); e os ácidos gordos, que são os principais constituintes das gorduras, e que nos vegetais existem na forma de ácidos gordos saturados (cáprico, palmítico, esteárico e mirístico), monoinsaturados (oleico e palmitoleico) e polinsaturados (docosahexanoico, eicosapentanoico, α -linolénico), presentes em concentrações elevadas nos vegetais de cor verde, como é o caso do agrião (Pereira et al. 2001). Na tabela 1.3. podem ser consultados, alguns dados relativos à composição do agrião, no que diz respeito a metabolitos primários.

Tabela 1.3. – Composição nutricional do Agrião

Composto	Concentração (massa fresca)	Ref
Água	96,11 g/ 100g	(USDA n.d.)
Energia	11 kcal/ 100g	
Proteínas	2,30 g/ 100g	
Lípidos (total)	0,10 g/ 100g	
Hidratos de Carbono	1,29 g/ 100g	
Fibras	0,5 g/ 100g	
Açúcares (total)	0,20 g/ 100g	
Minerais		
Cálcio (Ca)	120 mg/ 100g	(USDA n.d.)
Ferro (Fe)	0,20 mg/ 100g	
Magnésio (Mg)	21 mg/ 100g	
Fosforo (P)	60 mg/ 100g	
Potássio (K)	330 mg/ 100g	
Sódio (Na)	41 mg/ 100g	
Zinco (Zn)	0,11 mg/ 100g	
Vitaminas		
Ácido ascórbico (C)	43,0 mg/ 100g	(USDA n.d.)
	59,6 ± 2,3 mg/ 100g ± dp	(Santos et al. 2012)
Tiamina (B1)	0,09 mg/ 100g	(USDA n.d.)
	70 ± 21 µg/ 100g ± dp	(Santos et al. 2012)
Riboflavina (B2)	0,120 mg/ 100g	(USDA n.d.)
	143 ± 7 µg/ 100g ± dp	(Santos et al. 2012)
Niacinamida (B3)	0,2 mg/ 100g	(USDA n.d.)
	111 ± 10 µg/ 100g ± dp	(Santos et al. 2012)
Ácido pantolénico (B5)	263 ± 3 µg/ 100g ± dp	(Santos et al. 2012)
Piridoxina (B6)	0,129 mg/ 100g	(USDA n.d.)
	13 ± 0,1 µg/ 100g ± dp	(Santos et al. 2012)
Ácido fólico (B9)	9 µg/ 100g	(USDA n.d.)

Tabela 1.3. – Composição nutricional do Agrião (continuação)

α-tocoferol (E)	1 mg/ 100g 2,5 \pm 0,2 mg/ 100g \pm dp	(USDA n.d.) (Santos et al. 2012)
Filoquinona (K1)	250 μ g/ 100g	(USDA n.d.)
Ácidos Gordos		
Saturados (total)	0,027 g/ 100g 77,5 \pm 13,7 mg/ 100g \pm dp	(USDA n.d.) (Pereira et al. 2001)
Monoinsaturados (total)	0,008 g/ 100g 36,6 \pm 7,4 mg/ 100g \pm dp	(USDA n.d.) (Pereira et al. 2001)
Polinsaturados (total)	0,035 g/ 100g 260 \pm 91 mg/ 100g \pm dp	(USDA n.d.) (Pereira et al. 2001)
Ácidos Gordos (total)	374 \pm 107 mg/ 100g \pm dp	(Pereira et al. 2001)
α-linolénico (c 18:3)	179,6 \pm 70,5 mg/ 100g \pm dp	
Oleico (c 18:1)	4,2 \pm 1,2 mg/ 100g \pm dp	
Hexadecatrienoico (c 16:3)	45,4 \pm 13,7 mg/ 100g \pm dp	

Os metabolitos secundários dividem-se em 4 classes principais: fenóis e polifenóis (cerca de 8000 compostos, entre os quais os flavonóides e os ácidos fenólicos), terpenóides (aproximadamente 25000 compostos, divididos em monoterpenos, carotenóides e fitoesteróis), alcalóides (cerca de 12000 compostos) e compostos contendo um grupo sulfuroso, tais como glucosinolatos e isotiocianatos (Harborne 1999 e Hounscome et al. 2008).

1.3.1.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos naturais constituintes de alimentos de origem vegetal, como frutas, legumes, leguminosas e cereais, mas também de bebidas como vinho, o chá e o café (Quideau et al. 2011). Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são os metabolitos secundários mais abundantes das plantas. O estudo dos polifenóis tem atraído cada vez mais reparo, devido às suas potentes propriedades antioxidantes e à sua acção na prevenção de várias doenças relacionadas com o *stress* oxidativo. Possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo, formando uma família de compostos com aproximadamente 8000 estruturas conhecidas. De acordo com a sua estrutura química, classificam-se em cinco grupos: os ácidos fenólicos, os flavonóides, os estilbenos, os taninos e as lignanas (Dai & Mumper 2010) (tabela 1.4.).

Tabela 1.4. - Diferentes classes de compostos fenólicos (adaptado de Dai & Mumper 2010 e Paredes-López et al. 2010)

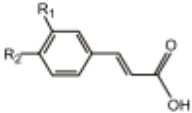
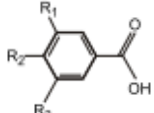
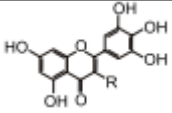
	Nome	Esqueleto	Estrutura Química	Exemplos
Compostos Fenólicos	Ácidos Fenólicos	Hidroxicinâmicos	C ₆ – C ₃ 	cafeico, ferúlico, p-cumárico
		Hidroxibenzóicos	C ₆ – C ₁ 	gálico, vanílico, protocatechuico
	Flavonóides	Flavonóis	C ₆ – C ₃ – C ₆ 	quercetina, miricetina, canferol

Tabela 1.4. - Diferentes classes de compostos fenólicos (adaptado de Dai & Mumper 2010 e Paredes-López et al. 2010) (continuação)

Compostos Fenólicos	Flavonóides	Antocianinas		cianidina, malvidina, delfinidina	
		Flavanóis		catequina. epicatequina, gallocatequina	
	Estilbenos	$C_6 - C_2 - C_6$		resveratrol, pterostilbeno	
	Taninos	Condensados	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$		oligomérico, proantocianidinas
		Hidrolisados			di-O-galloyl-β-D-glucose
	Lignananas		$(C_6 - C_3)_2$		lignóides, ciclolignóides, neolignananas

A matriz agrião é abundante em compostos fenólicos e os resultados de diversos estudos que comprovam este facto, podem ser consultados na tabela 1.5..

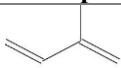
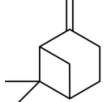
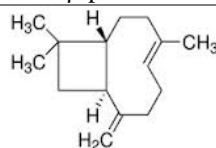
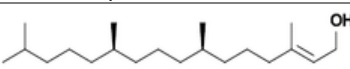
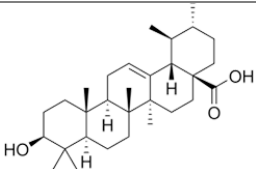
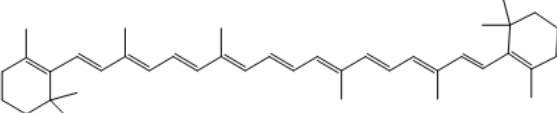
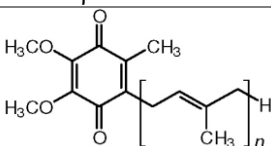
Tabela 1.5. - Composição do agrião em compostos fenólicos

Composto	Solvente Extração	Concentração	Ref
Fenóis Totais	70% MeOH:30% H ₂ O	1,68±0,06 mg EAG/ g m.f.	(Hassimotto et al. 2005)
Fenóis Totais	Acetonitrilo 96%	0,54 mg EAG / g m.f.	(Lako et al.2007)
Fenóis Totais	50% MeOH:50% H ₂ O	263 mg / 100 g m.f. (HPLC)	(Martínez-Sánchez et al. 2008)
Fenóis Totais	70% EtOH:30% H ₂ O	96,2±3,5 mg EAG / g e.s.	(Yazdanparast et al. 2008)
Fenóis Totais	70% Acetona:29,5% H ₂ O:0,5% Ác. acético	1,86 mg EAG / g m.f.	(Isabelle et al. 2010)
Fenóis Totais	80% EtOH:20% H ₂ O	12,5±0,93 mg EAG / g m.s	(Tiveron 2010)
Fenóis Totais	70% MeOH:30% H ₂ O	4975,0±22,0 mg / kg m.s. (HPLC)	(Aires et al. 2013)

1.3.1.2. Terpenos

Os terpenos são uma família de compostos químicos que se caracterizam pela sua composição contendo um esqueleto de isopreno agrupado a cadeias ramificadas de cinco carbonos (C5) (Hounsome et al. 2008). De acordo com o número de unidades de isopreno, ou seja, o número de carbonos da molécula, os terpenos dividem-se em diferentes tipos de classes (tabela 1.6.). Monoterpenos são naturalmente os hidrocarbonetos que possuem duas unidades de isopreno. Representam 90% da constituição de óleos essenciais, sendo responsáveis pelas suas características organolépticas (Bizzo et al. 2009 e Sánchez-González et al. 2011), correspondendo normalmente a 5% da massa seca de uma planta (Croteau et al. 2000). Estes podem ser encontrados em muitas frutas, legumes, ervas aromáticas e especiarias, mas também podem ser usados como aromatizantes alimentares (Sánchez-González et al. 2011).

Tabela 1.6. – Diferentes classes de terpenos (adaptado de Zhang et al. n.d.)

Terpenos	Nome	Nº carbonos	Exemplo
	Hemiterpenos	5	 Isopreno
	Monoterpenos	10	 β-pineno
	Sesquiterpenos	15	 β-cariofileno
	Diterpenos	20	 Fitol
	Triterpenos	30	 Ácido Ursólico
	Tetraterpenos	40	 β-caroteno
	Politerpenos	+ 40	 Ubiquinona

Estudos anteriormente realizados ao agrião, demonstraram que o seu óleo essencial é bastante rico em terpenos, tal como se pode visualizar na tabela 1.7..

Tabela 1.7. – Composição (% área) do óleo essencial obtido a partir de folhas e caules de agrião (adaptado de Amiri 2012)

Composto	Composição (% área total) ^(a)	
	Folhas	Caules
β-pineno	0,3	-
β-mirceno	0,4	-
Octanal	-	1,3
Limoneno	16,7	11,8
α-terpinoleno	8,9	15,2
p-cimen-8-ol	3,1	17,6
α-copaeno	-	2,2
β-cariofileno	4,3	13,1
Miristicina	57,6	-
Óxido de Cariofileno	4,2	37,2
Neofitadieno	1,5	1,6

^(a) área total de um cromatograma obtido por GC-MS

1.3.1.3. Carotenóides

Das várias classes de pigmentos na natureza, os carotenóides estão entre os mais comuns e importantes, especialmente devido às suas funções variadas. São pigmentos lipofílicos encontrados principalmente em vegetais, frutas, flores e algas, podendo também ocorrer em leveduras, bolores e bactérias fotossintéticas. Os carotenóides mais abundantes nos alimentos são o β -caroteno, o α -caroteno, o γ -caroteno, o licopeno, a luteína, a β -criptoxantina, a zeoxantina e a astaxantina.

Podem ser usados como antioxidantes em suplementos alimentares, corantes em alimentos e bebidas, bem como pigmentos em aves e peixes. Os carotenóides são importantes para a saúde humana, mas a sua estrutura determina em última instância a sua função biológica. Nas últimas décadas têm sido estudados e comprovados, os efeitos protectores dos carotenóides contra distúrbios graves, como cancro (Donaldson 2004 e Kantoff 2006), doenças cardiovasculares (Sesso et al. 2003) e doenças oculares degenerativas (Mozaffarieh et al. 2003). Todo o reconhecimento tem motivado a investigação contínua nesta área, de modo a demonstrar o papel dos carotenóides como antioxidantes e como reguladores da resposta imunitária (Chew & Park 2004, Tapiero et al. 2004 e Ciccone et al. 2013).

O agrião está reportado como sendo uma fonte natural de luteína e zeoxantina, dois carotenóides que são reconhecidos pela sua habilidade em proteger a visão e fomentar a saúde cardíaca (Kimura & Rodriguez-Amaya 2003 e Stringheta et al. 2006). Também o β -caroteno pode ser encontrado na matriz desta brássica em concentrações consideráveis, auxilia no combate a danos relacionados com a radiação ultravioleta (UV) que ao incidir na pele, pode acelerar o seu envelhecimento, suprimindo o sistema imunológico, o que em última instância pode originar cancro da pele (Gill et al. 2007). Na tabela 1.8. estão apresentados valores de carotenóides reportados na literatura, para o agrião.

Tabela 1.8. – Concentração dos principais carotenóides presentes no agrião

Composto	Concentração (massa fresca)	Ref
Luteína	10,713 mg/ 100g	(O'Neill et al. 2001)
	75,4 ± 10,2 µg/ g ± dp	(Kimura & Rodriguez-Amaya 2003)
	9,52 ± 1,41 mg/ 100g ± dp	(Kopsell et al. 2007)
Zeoxantina	0,60 ± 0,11 mg/ 100g ± dp	(Kopsell et al. 2007)
β-caroteno	5,919 mg/ 100g	(O'Neill et al. 2001)
	36,9 ± 7,2 µg/ g ± dp	(Kimura & Rodriguez-Amaya 2003)
	8,3 ± 0 µg/ g ± dp	(Santos et al. 2012)
	0,93 ± 0,27 mg/ 100g ± dp	(Kopsell et al. 2007)

A evidência epidemiológica tem consistentemente fornecido correlações positivas entre determinadas dietas, alimentos específicos e a expressão de doenças, sendo que dietas ricas em frutas, vegetais e grãos têm sido associadas com a prevenção de diversas patologias. Durante a avaliação dos componentes químicos desses grupos de alimentos tornou-se aparente que os benefícios para a saúde não se correlacionam somente com teor de nutrientes, uma vez que foram identificados muitos fitoquímicos que exibem bioatividade na prevenção de doenças (Bidlack et al. 2000). Uma avaliação mais aprofundada dos mecanismos de acção dos compostos bioativos apresentados continua a ser essencial para a compreensão do tipo de bioatividade fornecida aquando do seu consumo.

1.4. Bioatividade

Do ponto de vista farmacológico, vários estudos referem que o agrião possui actividade anticancerígena, com benefícios demonstrados contra o cancro do cólon, cancro da mama, cancro dos pulmões, cancro da próstata; actividade antioxidante; actividade anti-inflamatória; e que apresenta efeitos cardiovasculares benéficos (Yazdanparast et al. 2008 e Costain 2012).

1.4.1. Actividade Antioxidante

O *stress* oxidativo constitui um mecanismo unificador de lesão de diversos tipos de doenças, tais como a diabetes, doenças neuro-degenerativas e cardiovasculares, doenças inflamatórias e cancro, o que o torna um alvo interesse para a prevenção e terapêutica destas enfermidades. As reacções de oxidação são uma parte essencial do metabolismo. O *stress* oxidativo ocorre quando há um sério desequilíbrio entre a geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e os sistemas de defesa antioxidante no organismo se encontram debilitados (Rodrigo et al. 2011). As ROS são continuamente produzidas dentro das células, como resultado de processos de transferência de electrões da mitocôndria ou como produtos de enzimas, sendo também gerados como consequência do metabolismo de xenobióticos, neutrófilos activados, exposição a raios UV, factores ambientais, etc. (Halliwell 1996).

Ao longo dos últimos anos, diferentes plantas medicinais foram investigadas quanto à sua actividade de extinção de ROS. Estes antioxidantes naturais além de evitarem a oxidação de lípidos, também podem fornecer benefícios de saúde associados com a prevenção de danos provocados pelas espécies reactivas de oxigénio. Estes efeitos benéficos de frutas e vegetais têm sido atribuídos, em parte, a compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, que actuam como antioxidantes, através de reacções mediadas por radicais livres (Bahramikia & Yazdanparast 2010). Os antioxidantes são definidos como

moléculas que protegem um alvo biológico contra danos oxidativos. Antioxidantes exógenos ou antioxidantes alimentares são aqueles que são obtidos a partir da dieta e incluem fitoquímicos, tais como vitamina E, C e β -caroteno, minerais (zinco e selénio), enzimas e cofactores, polifenóis, entre outros (Finley et al. 2011).

Diferentes estudos reportam que o agrião tem potente acção antioxidante contra vários sistemas oxidativos *in vitro*. As suas propriedades antioxidantes podem ser atribuídas à eficácia dos seus compostos bioactivos no sequestro de radicais livres, na capacidade de redução, e na inibição da peroxidação lipídica (Bahramikia & Yazdanparast 2010). Em 2008, Yazdanparast et al. determinaram a actividade sequestradora de radicais livres (DPPH) = 114,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o poder antioxidante por redução do ferro (FRAP) = $680,2 \pm 30,5 \mu\text{M}$ equivalente de ferro / mg. Também em 2008, Martínez-Sánchez et al, realizaram os mesmos ensaios e obtiveram resultados de 244 mg/ 100 g e 209 mg equivalente de ferro / 100 g de matriz fresca, respectivamente. Tiveron, 2010 avaliou a actividade antioxidante por DPPH, sistema β -caroteno/ ácido linolénico e FRAP ($24,8 \pm 2,12 \%$, $70,9 \pm 4,6 \%$ e $0,27 \pm 0,018 \mu\text{M}$ equivalente de ferro / mg). Ainda em 2010, Isabelle et al, obtiveram o valor de 28,72 $\mu\text{M ET}/\text{g}$ de massa fresca, no ensaio de Capacidade de Absorção dos Radicais de Oxigénio (ORAC).

1.5. Nutracêuticos e Cosmecêuticos

Actualmente é amplamente reconhecido que uma dieta rica em frutos e vegetais fornece benefícios de saúde com consequente redução do risco de doenças crónicas (Shahidi 2009). Em resposta às demandas de consumidores cada vez mais conscientes destes benefícios, as indústrias alimentares estão a desenvolver produtos que, não têm apenas como objectivo fornecer apelo sensorial superior, mas também procuram valorizar as suas características nutricionais. Os cientistas e indústrias exploraram vários termos, tais como, "alimentos funcionais", "alimentos com características nutricionais específicas", "nutracêuticos", "suplementos alimentares", "alimentos medicinais", entre outros, para descrever os compostos bioactivos e os alimentos que os contêm (Palthur et al. 2010). O termo nutracêutico foi afirmado pela primeira vez por De Felice, director da Fundação para a Inovação em Medicina e define-se como suplementos dietéticos que proporcionam uma forma concentrada de um agente bioactivo extraído de um alimento, posteriormente apresentado numa matriz não-alimentar (ex. pílulas, extractos, etc.) e utilizado com a finalidade de melhorar a saúde em doses que excedem aquelas que poderiam ser obtidas através do consumo do dito alimento (Dillard & German 2000).

Do mesmo modo, nas últimas décadas registou-se um crescimento do interesse nos produtos sob o rótulo de "naturais", nomeadamente cosméticos. Estudos indicam que o mercado internacional de produtos naturais para cuidado pessoal segue um crescimento médio anual avaliado em torno de 8 a 25%, facto que se deve principalmente, à associação destes produtos a um estilo de vida mais saudável (Rastogi et al. 1996 e Jones & Duerbeck 2004). A padronização dos produtos naturais usados na elaboração destes cosméticos é realizada a partir de um sistema de codificação de ingredientes (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient* - INCI), que se baseia em nomenclaturas de acordo com listas internacionais utilizadas por investigadores. Dentre as matérias-primas com maior potencialidade para o desenvolvimento de produtos naturais na indústria de cosméticos, destacam-se plantas medicinais e extractos vegetais (Miguel 2011). Os extractos vegetais são multifuncionais possuindo diversas propriedades, como foto

protecção, anti-envelhecimento, acção hidratante, antioxidante, adstringente, anti-irritante e atividade antimicrobiana. A exposição diária da pele origina a produção de espécies reactivas de oxigénio, que podem reagir com o ADN, as proteínas e os ácidos gordos, causando danos oxidativos, com consequente fotoenvelhecimento (aparecimento de rugas, diminuição da elasticidade, pigmentação da pele, etc.). Na tabela 1.9., podem ser consultadas aplicações de extractos vegetais e suas acções (Chanchal & Swarnlata 2008).

Tabela 1.9. – Aplicações cosméticas de extractos vegetais e suas acções (adaptado de Chanchal & Swarnlata 2008)

Propriedades	Compostos Bioativos e Matrizes	Acção
Antioxidante	Vitamina C e E, Polifenóis, curcumina, silimarina, resveratrol, ginkgo, genisteína	<ul style="list-style-type: none"> • Neutraliza os efeitos prejudiciais das espécies reactivas de oxigénio e outros radicais livres. • Reduz eritemas e imunossupressão causada pela luz solar.
Anti-envelhecimento	Picnogenol, centelha, extractos oleólicos, tetrahidrocurcuminoides	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula o crescimento celular e reparação da pele. • Repara a perda da elasticidade da pele. • Inverte as alterações químicas que ocorrem com o envelhecimento do colagénio e normaliza o sistema imunitário.
Hidratante	Retinóides, ácidos gordos, aloé vera	<ul style="list-style-type: none"> • Promove a excreção de citocininas responsáveis por edemas e vasodilatação.
Esfoliante	Arnica	<ul style="list-style-type: none"> • Preenche os espaços entre as camadas reduzindo as linhas finas. • Conduz à diminuição dos poros da pele. • Controla a pele oleosa e reduz o pH da face.
Anti-irritante e anti-inflamatório	Óleos essenciais	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe a liberação de histamina e alivia a irritação

O uso do extracto de agrião foi reportado como restaurador de cabelo, devido aos seus efeitos na melhoria da circulação sanguínea (Makoto et al. 2001) e devido à promoção do crescimento celular endotelial (Koichiro & Aki 2002). No entanto os seus efeitos sobre o envelhecimento da pele ainda não estão totalmente esclarecidos.

1.5.1. Acção anti-pigmentante

A melanina é um pigmento que confere à pele e ao cabelo a sua cor natural. O aumento da produção e consequente acumulação é sintoma de diferentes doenças da pele e denomina-se h́per-pigmentação. O facto das manchas resultantes desta condição se localizarem, predominantemente, em zonas dérmicas expostas, a h́per-pigmentação tem alcançado relevância psicossocial e cosmética. Deste modo, têm sido desenvolvidos esforços na investigação de agentes despigmentantes, isto é, que intervêm na síntese da melanina (Briganti et al. 2003). A Tirosinase (TYR) é a enzima essencial na formação de melanina, catalisando várias reacções que constituem a via melanogénica. O estudo da inibição da sua actividade adquire importância para o controlo da pigmentação da pele (Kim et al. 2012). Como resultado do papel fundamental desempenhado pela TYR na biossíntese da melanina, a maioria dos agentes branqueadores

actuam especificamente para reduzir a função desta enzima por meio de vários mecanismos (Briganti et al. 2003). O Agrião é naturalmente rico em compostos hidrossulfurosos. O seu extracto é capaz de complexar o co-factor de cobre formando um composto que priva a TYR do co-factor, desactivando-a (Rahn 2009).

1.5.2. Acção anti-rugas

As rugas são um dos primeiros sinais de envelhecimento da pele. Apresentam-se como linhas de expressão extremamente marcadas e resultam da perda de elasticidade da pele (Baumann 2007). As Metaloproteínases (MMP) são uma família de endopeptidases de zinco, capazes de digerir matrizes extracelulares, tais como, colagénio, elastina e membranas de glicoproteínas, sob determinadas condições fisiológicas. A exposição crónica a raios UV é conhecida por induzir a expressão de MMP, com consequente repartição das fibras de colagénio, resultando em modificações da estrutura da matriz extracelular, em alterações na integridade estrutural da derme e na formação de rugas (Kim et al. 2006). Inomata et al. 2003 reportou que a indução da actividade da gelatinase por radiação ultravioleta B na pele, contribui para a formação de rugas através da destruição da estrutura da membrana e do colagénio dérmico, e que a aplicação tópica de inibidores de MMP's revelou-se uma forma eficaz para superar este problema.

A incorporação de alimentos-chave na dieta, contendo compostos antioxidantes, minerais (zinco, crómio, etc.) que são conhecidos pelas suas propriedades anti-envelhecimento, podem retardar os efeitos dérmicos da idade. Os vegetais de cor verde, como é o caso do agrião, são ricos em vitamina c e carotenóides, incluindo a luteína e a zeoxantina, que auxiliam na prevenção de problemas relacionados com o envelhecimento (Practitioner 2009).

1.5.3. Absorção Cutânea

Absorção cutânea ou dérmica é o processo complexo, pelo qual uma substância é transportada através da pele e é absorvida para o organismo. A pele é uma bio membrana de várias camadas com características de absorção particulares, susceptíveis a mudanças constantes. A absorção cutânea é influenciada por vários factores, como por exemplo propriedades físico-químicas da substância, veículo, concentração, padrão de exposição, localização da superfície dérmica no corpo, etc. Os ensaios de absorção são geralmente testados em de acordo com as metodologias descritas por plataformas internacionais, nomeadamente a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD) e o Centro Europeu de Ecotoxicologia e de Toxicologia das Substâncias Químicas (ECETOC) (EC 2004).

Os métodos para a medição da absorção dérmica podem ser divididos em duas categorias: *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro* têm sido bastante utilizados e aperfeiçoados nas últimas décadas. Estes medem difusão de produtos químicos para o organismo. Tais métodos são muitas vezes utilizados para analisar a libertação de substâncias químicas para o organismo, podendo também proporcionar modelos úteis para a avaliação de absorção percutânea nos seres humanos (OECD 2004).

O uso de células de difusão estáticas, *in vitro* para avaliar a permeabilidade da pele transformou-se numa das principais metodologias de pesquisa, fornecendo informações importantes sobre as relações entre a pele, fármacos e sua formulação. Este tipo de teste é muito útil não só para a concepção e desenvolvimento de novas formulações, mas também para fins de controlo de qualidade e de toxicidade. Frequentemente recorre-se à célula de difusão de Franz, usando membranas sintéticas para modelar a pele

verdadeira (Ng et al. 2010). A célula de difusão é constituída por uma câmara e um compartimento receptor, entre os quais a membrana é posicionado (Figura 1.3.). A célula deve proporcionar uma fácil recolha de amostras e um bom controlo da temperatura da célula e do seu conteúdo (OECD 2004).

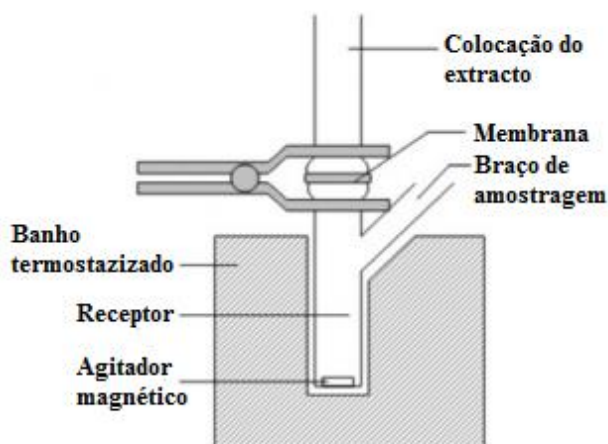


Figura 1.3. – Representação de uma célula de Franz (estática) (adaptado de Ng et al. 2010)

1.6. Extracção sólido-líquido de compostos bioativos

O objectivo da uma extracção é maximizar o rendimento em compostos de interesse, e simultaneamente minimizar a extracção de compostos indesejáveis. Como uma alternativa aos processos de extracção não convencional, como é o caso da extracção com líquido pressurizado, extracção com fluido supercrítico, extracção assistida de microondas ou de ultra violeta, que requerem instrumentação e materiais específicos, têm sido investigados sistemas de água:co-solvente na extracção de vários compostos vegetais. Métodos de extracção sólido-líquido usados para a extracção de fitoquímicos de plantas incluem maceração, infusão e extracção Soxhlet. Estes processos envolvem a difusão do solvente para as células de plantas, a solubilização dos fitoquímicos da matriz e por fim difusão do solvente enriquecido em fitoquímicos para o exterior das células vegetais. Para produzir extractos ricos em fitoquímicos para incorporação em alimentos e bebidas, é necessário utilizar solventes de qualidade alimentar (por exemplo, água, etanol ou misturas destes). A água é um solvente polar que tem sido utilizado há muitos anos para extrair fitoquímicos de plantas. Por exemplo, infusões de ervas medicinais ou chás foram usados tradicionalmente para tratar diferentes problemas, como é o caso das infecções (Harbourne et al. 2014).

1.6.1. Extracções com EtOH

O etanol também pode ser utilizado como um solvente de extracção, porque mesmo se for encontrado no extracto final é seguro para consumo humano. Nos termos da legislação da UE, um alimento contendo etanol em concentração superior a 1,2%, deve ser consumido (EPCE 2006). Portanto, se o solvente de extracção contém etanol, este deve ser diluído ou removido antes da inclusão do extracto num alimento funcional ou bebida. Dependendo da polaridade dos compostos que se pretendem extrair, pode ser necessário recorrer a misturas hidroalcoólicas (a água extrairá os compostos mais polares e o etanol, os compostos que são mais hidrofóbicos) (Harbourne et al. 2014). O sistema de água - EtOH foi estudado amplamente para a extracção de vários compostos fitoquímicos de plantas medicinais. Em 2007, Durling

et al estudaram a extracção de compostos fenólicos e óleos essenciais da *Salvia officinale* usando diferentes concentrações de misturas de água-EtOH; dois anos depois, Cho *et al* optimizaram a extracção com solvente etanol, de isoflavonas a partir de feijões de soja, variando a concentração de solvente, a temperatura de extracção e o tempo de extracção.

1.6.2. Extracções com PG

Por outro lado, o sistema de água - PG foi ainda pouco investigado no que diz respeito à sua eficiência na extracção de compostos naturais, apesar de se atribuir a este solvente aplicações farmacêuticas reconhecidas (melhora a solubilidade em água de fármacos lipofílicos, tais como o valdecoxib ou o paracetamol (Liu *et al*, 2005 e Jouyban *et al*, 2007) e de ser utilizado como conservante alimentar (Tubtimdee & Shotipruk, 2011). Ardisson *et al*, em 2002, por considerarem pouco se conhecer sobre os melhores métodos para a obtenção de extractos com solvente PG, realizaram um trabalho com o objectivo de preparar e caracterizar extractos enriquecidos em taninos, variando a concentração de PG numa solução aquosa; concluíram que o PG a 70% é o mais específico para a extracção dos taninos da *Stryphnodendron adstringens*. Pode ser consultado um resumo das vantagens do uso de PG, na tabela 1.10..

Tabela 1.10. – Vantagem da utilização de Propilenoglicol, quer em formulações de novos produtos, quer como solvente extractor (adaptado de Dow 2000)

Vantagem	Descrição
Excelente acção solvente	É completamente miscível em água e em muitos materiais orgânicos como álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, assim como óleos e gorduras vegetais/ animais, propriedade que é benéfica na solubilização e estabilização de produtos para cosméticos e alimentos.
Baixa toxicidade	Atributo único entre os glicóis permitindo que seja utilizado como aditivo directo em alimentos e produtos farmacêuticos.
Acção umectante	Tem a habilidade de atrair e reter água num produto, sendo um dos materiais mais efectivos aprovados como umectante para alimentos, preferível a compostos como sorbitol, manitol e glicerina na sua habilidade de reter água.
Reconhecido com GRAS pela FDA	É aprovado como substância de uso múltiplo pela <i>Food and Drug Administration</i> (FDA) como aditivo em numerosos alimentos, produtos farmacêuticos e drogas, possuindo por isso denominação GRAS (<i>Generally Recognized As Safe</i>).
Cor e Odor	É incolor e inodoro, propriedades que facilitam seu uso em formulações.
Baixa volatilidade	A pressão de vapor do PG é 0,08 mmHg/ 20°C, vantagem desejável em formulações de produtos que atendem a regulamentações de baixas emissões.

1.6.2.1. Aplicações do Propilenoglicol em Cosméticos

O Propilenoglicol é utilizado como veículo, emoliente, controlador de viscosidade, plastificante e umectante em muitos tipos de cosméticos. Actualmente entra na composição de mais de 4000 produtos cosméticos, entre os quais desodorizantes, produtos para a pele, produtos para o cabelo, etc.. É um excelente solvente para muitos corantes e a estabilidade de emulsões água/ óleo pode frequentemente ser melhorada

com a adição de PG, que actua como co-emulsificante. O *Cosmetic Ingredient Review Committee* aprovou o seu uso em concentrações $\leq 50\%$ nos diversos cosméticos (CIR 1993). Em produtos para a pele o PG ajuda a estabilizar a emulsão e também actua como hidratante; no caso de produtos anti- envelhecimento contendo colagénio, a habilidade do propilenoglicol em penetrar através da pele pode aumentar a efectividade dos mesmos (Dow 2000).

1.7. Objectivo e Estrutura da Tese

Esta tese explora a obtenção de um extracto de agrião rico em compostos bioativos com potencial aplicação em indústria de cosméticos, partindo de solventes GRAS.

Para alcançar este objectivo, o trabalho foi dividido em 3 partes, tal como esquematicamente representado na figura 1.4..

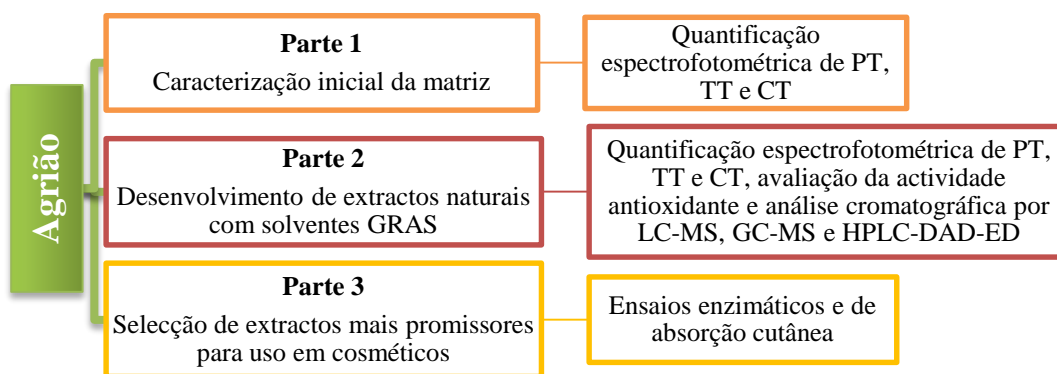


Figura 1.4. – Esquematização da estrutura da Tese

A primeira parte do trabalho consistiu na caracterização da matriz considerando três famílias de compostos alvo, compostos fenólicos, terpenos e carotenóides. Foram então realizadas três extracções com a finalidade de obter extractos ricos nestes compostos bioativos, que foram quantificados recorrendo a métodos espectrofotométricos. A parte dois foi realizada com a finalidade de obtenção de extractos naturais com dois solventes GRAS (EtOH e PG). Para tal foram utilizados dois desenhos de experiências, num total de 26 extractos. Estes extractos foram analisados por métodos espectrofotométricos (PT, TT e CT) e a sua actividade antioxidante foi determinada por métodos de fluorescência (ORAC, HORAC e HOSC). Os resultados foram tratados estatisticamente pela metodologia de superfície de resposta. Tendo em conta os resultados anteriores, foram escolhidos extractos para análise cromatográfica por LC-MS, GC-MS e HPLC-DAD-ED. Por fim, o potencial para aplicação em cosmética foi avaliado com recurso a ensaios de inibição enzimática (Tirosinase e Metaloproteínase 1) e com o estudo de absorção cutânea, usando uma célula de Franz.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Nas extracções realizadas, quer para a caracterização da matriz, quer para os Designs de Experiências, usou-se Metanol, Hexano, Etanol Absoluto (Carlo Erba, Val de Reuil, França), Propilenoglicol (Labsolve, José Manuel Gomes dos Santos, Portugal), Água Ultra-Pura (Milli-Q) (ITQB, Oeiras), Hidróxido de Potássio (KOH) e Sulfato de Sódio Anidro (Na_2SO_4) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, França). Para a caracterização fitoquímica dos extractos, os ensaios efectuados careceram de reagente de Folin Ciocalteu (Panreac, Barcelona, Espanha), Carbonato de Sódio (Na_2CO_3) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, França), Ácido Gálico (Fluka, Alemanha), Ácido Sulfúrico (Panreac, Barcelona, Espanha), Linalool e Vanilina (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, França) e β -caroteno (Extrasynthese, Genay, França).

Nos ensaios para análise da actividade antioxidante utilizaram-se os seguintes reagentes: 2', 2'-azobis (2 - amidinopropano) dihidroclorado (AAPH), ácido 6-hidroxi-2, 5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), ácido cafeico ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$), fluoresceína (FL), fluoreto de cobalto tetrahidratado (CoF_2), ácido picolínico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$), cloreto de ferro (III) (FeCl_3), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e acetona $\geq 99,5\%$ foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, França). O cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), o fosfato de monopotássio (KH_2PO_4) e o fosfato de sódio dibásico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, França) foram usadas para a preparação do tampão fosfato (PBS). O fosfato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e o di-hidrogenofosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) também adquiridos à Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, França) foram usados na formulação do tampão fosfato de sódio (SPB).

Na caracterização cromatográfica por LC-MS e HPLC-DAD-ED foram testados os seguintes padrões: luteolina-7-glucósido, canferol-3-glucósido, canferol, quercetina, ácido clorogénico, rutina, apigenina-7-glucósido, apigenina e isoramentina (Extrasynthese, Genay, França), ácido gálico (Fluka, Steinheim, Alemanha), 5-HMF, ácido protocatechuico, ácido p-hidroxibenzóico, catequina, ácido cafeico, siringaldeído, ácido ferúlico, ácido p-cumáricos, ácido salicílico e ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (Sigma-Aldrich, St Louis, França/ Steinheim, Alemanha). Na caracterização cromatográfica por GC-MS utilizaram-se duas misturas de alcanos (C8-C20 e C10-C40) (Fluka, Steinheim, Alemanha).

As enzimas necessárias nos ensaios enzimáticos realizados, Tirosinase e Metaloproteínase 1 (MMP-1), foram adquiridas à Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, França); os substratos L-DOPA, e MMP Fluorogénico foram adquiridos a Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, França) e Enzo Life Science (Nova Iorque, Estados Unidos da América), respectivamente. O solvente dimetilsulfóxido (DMSO) e o ácido Kójico foram comprados a Carlo Erba (Val de Reuil, França) e Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, França). Trizma e Azida de Sódio (NaN_3) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, França), Cloreto de Cálcio (CaCl_2) (Kemira, Helsinquia, Finlândia) e Brij 35 (Fisher Scientific, Loughborough, Inglaterra) foram utilizados para a preparação do tampão Tris-HCl, necessário no ensaio de inibição de MMP – 1. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e a albumina de soro bovino (BSA) fora comprados à Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, França). Para o ensaio de absorção cutânea utilizou-se uma membrana Strat-M™

(Merck, Darmstadt, Alemanha). O PBS usado no ensaio de absorção cutânea foi adquirido a Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, França).

2.2. Matéria-Prima e sua Preparação

A matéria-prima utilizada para desenvolver este trabalho experimental foi fornecida pela empresa Vitacress®, representante do Grupo RAR no mercado de Produtos Frescos. O agrião apresentava-se devidamente empacotado em embalagens de 2 kg. Após recepção da matéria-prima, esta foi armazenada a -20 °C. Imediatamente antes de cada extracção, o agrião foi imerso em azoto líquido durante alguns minutos, sendo em seguida triturado recorrendo a uma Picadora Moulinex® 1,2,3 Clássica.

2.3. Extracções sólido-líquido para caracterização da matriz

2.3.1. Extracção para caracterização do agrião – Polifenóis Totais

Para se proceder a uma caracterização inicial da matriz agrião, no que diz respeito ao seu conteúdo em compostos fenólicos é realizada uma extracção sólido – líquido hidroalcoólica segundo a metodologia adaptada de Aires et al. 2013. Pesou-se 2 g de matéria-prima fresca triturada, e adicionou-se 10 mL de metanol:água (3:1 v/v); aqueceu-se a 70 °C durante 30 minutos, homogeneizando a cada 5 min. O extracto foi centrifugado (Hettich Mikro 220R, Tuttlingen, Alemanha) (4000 rpm / 10 minutos), filtrado e seco num rotavapor (BUCHI Rotavapor R -210, Flawil, Suíça) 40 °C. Ressuspendeu-se em 6 mL metanol:água (3:1 v/v). Acondicionou-se a -20 °C.

2.3.2. Extracção para caracterização do agrião – Terpenos Totais

Para a caracterização da matriz no que respeita a terpenos totais, foi adaptada uma extracção Soxhlet realizada por Al-jumaily & Al-amiry 2012 para extracção de terpenos da noz-de-moscada. 52 g de agrião foram colocadas num papel de filtro de forma cilíndrica, no interior do Soxhlet; adicionou-se 260 mL de metanol a um balão de fundo redondo. O vapor resultante da ebulição do solvente é encaminhado para um condensador que, após passagem ao estado líquido entra em contacto com a amostra no sifão, arrastando os compostos solúveis presentes, durante diversos ciclos, num total de 8 h. Após esse período, a o extracto foi filtrado sob vácuo, seco num rotavapor (BUCHI Rotavapor R -210, Flawil, Suíça) a 40 °C e redissolvido em 25 mL de metanol:água (5:1 v/v). O extracto foi mantido a -20 °C até se proceder à sua caracterização.

2.3.3. Extracção para caracterização do agrião – Carotenóides Totais

Para a extracção dos carotenóides totais adaptou-se a metodologia realizada por Rodriguez 2001. Inicialmente foi necessário a remoção do teor de água presente no agrião fresco, usando etanol. Para tal, pesou-se 15 g de matriz e misturou-se num almofariz de modo a formar uma pasta. Adicionou-se 30 mL de etanol e homogeneizou-se durante 5 min. Filtrou-se sob vácuo e guardou-se o filtrado, o papel de filtro e o bolo. Numa ampola de decantação juntou-se o filtrado e 15 mL de hexano, agitou-se e aguardou-se a separação das fases. A camada superior foi concentrada no rotavapor (BUCHI Rotavapor R -210, Flawil, Suíça) e posteriormente acondicionada a 4 ° C. Em seguida, 2 g de bolo + filtro foram extraídos durante 15 min com 10 mL de hexano. Filtrou-se a mistura sob vácuo e recolheu-se o filtrado (repetiram-se estes últimos dois passos até se obter filtrado incolor). Nesta altura juntou-se a camada superior concentrada anteriormente, e levou-se o extracto a concentrar no rotavapor, até um volume aproximadamente 10 vezes inferior. Adicionou-se ao concentrado 5 mL de solução de saponificação (40%

de hidróxido de potássio em metanol) e agitou-se 45 min a 56 ° C. O extracto foi transferido para uma ampola de decantação e foi lavado com 50 mL de hexano. Recolheu-se a camada inferior, adiu-se 5g de Sulfato de Sódio e procedeu-se a uma filtração a vácuo. Guardou-se a uma temperatura de -20 °C até à sua caracterização.

2.4. Desenho de Experiências – Optimização de Processo de Extracção

Para planejar e estruturar as extracções, optou-se pela elaboração de um desenho de experiências. Este estudo explora as condições de extracção “amigas” do ambiente, utilizando duas misturas água:co-solvente, contendo solventes GRAS (água:etanol (EtOH) e água:propilenoglicol (PG)), para a extracção de compostos bioativos a partir do agrião, pelo Método da Superfície de Resposta (*Response Surface Methodology* – RSM). Os parâmetros de extracção foram optimizados, de modo a melhorar o rendimento de extracção desses compostos bioativos naturais. A RSM é uma técnica estatística eficaz para analisar as interacções entre as variáveis de processo e optimização dos processos ou produtos, em que múltiplas variáveis podem influenciar os resultados. Os modelos matemáticos desenvolvidos, que podem descrever e prever os dados experimentais de extracção, poderão ser extremamente uteis para fornecer uma base confiável para estabelecer um processo de extracção eficaz dos compostos-alvo (Maran et al. 2013). Para a elaboração do desenho optou-se pela metodologia do *Box-Behnken Design* (BBD), em que as variáveis têm 3 níveis: cúbico baixo, central e cúbico alto. Cada experiência definida cruza o nível extremo das duas ou três variáveis de projecto com os valores médios das outras, incluindo também pontos centrais.

Resumidamente, realizaram-se 15 extracções convencional sob refluxo para cada um dos DOE (3 extracções repetidas com os pontos centrais, de modo a se avaliar o reprodutibilidade do método), num total de 26 extracções (quatro são comuns aos dois DOE's), tendo como parâmetros fixos a massa de matriz utilizada (5 g agrião fresco), o tempo de extracção de 1 h (a cinética realizada para determinar o tempo fixo de extracção pode ser consultada no anexo I) e a agitação de 750 rpm. As variáveis analisadas e os seus limites podem ser visualizadas na tabela 2.1. e foram escolhidas de acordo com trabalhos anteriormente realizados no laboratório de Nutracêuticos e Libertação Controlada. Após cada extracção, seguiu-se uma filtração a vácuo. Os extractos foram concentrados no rotavapor (BUCHI Rotavapor R -210, Flawil, Suíça), até ao volume total de PG adicionado, no caso do DOE H₂O: PG, ou até 6 mL nos extractos DOE H₂O: EtOH.

Tabela 2.1. – Variáveis estudadas nos DOE's EtOH:H₂O e PG:H₂O

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (X ₁)	20 °C	50 °C	80 °C
Razão Matriz:Solvente (X ₂)	1:6	1:4	1:2
Razão Água:Co-Solvente (X ₃)	1:0	1:1	0:1

O DOE fornecido pelo *software*, para as variáveis acima descritas, pode ser consultado no Anexo II. As identificações dos extractos [H₂O (n°), EtOH (n°) ou PG (n°)] e condições utilizadas para cada extracção estão descritas na tabela 2.2..

Tabela 2.2. – Identificação dos extractos e condições de extracção utilizadas

Condição	Extracto	Temperatura (°C)	Razão Matriz:Solvente	Razão Água:Co- Solvente
6	H ₂ O 6	20	1/4	0
7	H ₂ O 7	80	1/4	0
8	H ₂ O 8	50	1/6	0
11	H ₂ O 11	50	1/2	0
1	EtOH: H ₂ O 1/ PG: H ₂ O 1 ^(b)	50	1/4	0,5
2	EtOH: H ₂ O 2/ PG: H ₂ O 2	80	1/2	0,5
3	EtOH: H ₂ O 3/ PG: H ₂ O 3	20	1/2	0,5
4	EtOH 4/ PG 4	20	1/4	1
5	EtOH 5/ PG 5	50	1/6	1
9	EtOH: H ₂ O 9/ PG: H ₂ O 9 ^(b)	50	1/4	0,5
10	EtOH: H ₂ O 10/ PG: H ₂ O 10	20	1/6	0,5
12	EtOH: H ₂ O 12/ PG: H ₂ O 12 ^(b)	50	1/4	0,5
13	EtOH 13/ PG 13	80	1/4	1
14	EtOH 14/ PG 14	50	1/2	1
15	EtOH: H ₂ O 15/ PG: H ₂ O 15	80	1/6	0,5

^(b) estas 3 extracções, realizadas nas mesmas condições, são o controlo para testar a reprodutibilidade do DOE

2.4.1. Tratamento estatístico

Os resultados do BBD, relativos ao conteúdo polifenóis totais, terpenos totais e actividade antioxidante (ORAC, HORAC e HOSC), foram analisados utilizando o *software* Statistica™, versão 5 (Statsoft, Tulsa, EUA). Ambos os efeitos, linear e quadrático, de cada factor em estudo, bem como suas interacções foram calculados. A sua importância foi avaliada por análise de variância. A superfície descrita por uma equação polinomial de segunda ordem foi ajustada para cada conjunto de pontos de dados. Coeficientes de primeira e de segunda ordem das equações polinomiais foram obtidos por análise de regressão. O ajuste dos modelos foi avaliado pelos coeficientes de regressão (R^2) e R^2 ajustado (R_{adj}^2). O valor de R^2 fornece uma medida de quanto da variabilidade visualizada nos valores da resposta, pode ser explicada pelos factores experimentais e suas interacções. O valor de R^2 deve ser usado com prudência, pois tende a aumentar com a inserção de uma nova variável no modelo. Consequentemente é preferível o cálculo do R_{adj}^2 , pela equação 2.1., onde n é o número de experiências e p é o número de variáveis (factores) no modelo.

$$R_{adj}^2 = 1 - \frac{n-1}{n-p} (1 - R^2)$$

Equação 2.1. – Fórmula para o cálculo de R_{adj}^2

R_{adj}^2 é uma estimativa imparcial de R^2 . Este coeficiente ajustado considera que, o número de graus de liberdade residuais da regressão polinomial é sofre alterações com a alteração da ordem polinomial. Na prática, R^2 é sempre superior a R_{adj}^2 , e deve ser $\geq 0,75$.

2.5. Caracterização dos Extractos

2.5.1. Método Espectrofotométrico para determinação de Polifenóis Totais

A determinação dos compostos fenólicos totais presentes nos extractos de agrião foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Folin Ciocalteu elaborado por Singleton & Rossi 1965 e recentemente adaptado no laboratório de Nutracêuticos e Libertação Controlada (iBET, Oeiras) para leitura em espectrómetro de microplacas. Resumidamente, em microplaca transparente de 96 poços, 3 μ L das diluições adequadas de amostra/ água no caso do branco / padrão de ácido gálico para a curva de calibração, foram adicionados a 237 μ L de água destilada + 15 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu. Após aguardar alguns segundos, a reacção foi neutralizada com 45 μ L de uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e incubadas a 40 °C durante 30 minutos. A absorvância das amostras foram medidas a 765 nm num espectrómetro (Powerwave XS Microplate Spectrophotometer, Biotek, Winooski, EUA). O ácido gálico foi utilizado como padrão (0-800 mg / L) para a curva de calibração. Os resultados foram expressos em média de triplicatas (mg de equivalentes de ácido gálico por grama de massa fresca – mg EAG / g m.f.).

2.5.2. Método Espectrofotométrico para determinação de Terpenos Totais

A quantificação dos terpenos totais foi optimizada (anexo III) tendo como base o procedimento descrito por Doneva-Sapceska et al. 2006. Sinteticamente, a cada tubo de vidro de 5 mL adicionou-se 1200 μ L de solução padrão de linalool para a curva de calibração/ água para o branco/ diluições da amostras e 600 μ L de solução 2% vanilina:ácido sulfúrico (H_2SO_4). Misturou-se num vortex e colocou-se num banho de gelo de modo a minimizar o sobreaquecimento a solução. Seguiram-se dois banhos em água, primeiramente 20 min a 60 °C e posteriormente 5 min a 25 °C. As absorvâncias das amostras foram lidas ao comprimento de onda de 608 nm num espectrómetro (Genesys10uv, Thermo Spectronic, Nova Iorque, EUA). A curva de calibração foi realizada com soluções de linalool:água (1,25-20 mg linalool/ L água). Os resultados foram expressos em média de triplicatas (mg de equivalentes de linalool por grama de massa fresca – mg EL / g m.f.).

2.5.3. Método Espectrofotométrico para determinação de Carotenóides Totais

O teor total de carotenóides foi medido tendo como base o trabalho publicado por Scott 2001. Inicialmente realizou-se uma calibração com o carotenóide utilizado como padrão – β -caroteno. 1 mg de padrão de β -caroteno foi dissolvida em solução de 1 mL de Diclorometano e 9 mL de Hexano. Fizeram-se diluições em Hexano até se obter absorvância entre 0,3 e 0,7 AU, com leitura realizada num espectrómetro (Genesys10uv, Thermo Spectronic, Nova Iorque, EUA) a 450 nm.

Posteriormente, procedeu-se de forma semelhante para os extractos, sendo que foi necessário realizar-se uma extracção com hexano em ampola de decantação, devido a imiscibilidade dos solventes.

Assim sendo, colocou-se 2 mL de extracto numa ampola de decantação e adicionou-se 2 mL de hexano. Agitou-se vigorosamente e aguardou-se a separação das fases. A fase inferior foi armazenada e a superior foi novamente lavada, com 2 mL de hexano de cada vez, até não se verificar mais cor na fase inferior.

Para o cálculo da concentração de carotenóides totais recorreu-se à equação 2.2., onde A é a absorvância lida a 450 nm, V_1 é o factor de diluição, $A^{1\%}$ é o coeficiente de extinção ou absorvância de 1% da solução de β -caroteno (2592 AU) e $C^{1\%}$ é a concentração de 1% da solução. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de β -caroteno por 100 gramas de massa fresca – mg E β -c / 100 g m.f..

$$\text{Concentração de Carotenoides Totais } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{A \times V_1}{A^{1\%}} \times C^{1\%}$$

Equação 2.2. – Fórmula para determinação de carotenóides totais por espectrofotometria no visível

2.5.4. Identificação e Quantificação de Componentes Químicos presentes nos extractos, por Cromatografia Líquida Alta Eficiência com Detector de Díodos e Detector Electroquímico (*High-Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector – Electrochemical Detection (HPLC-DAD-ED)*)

As análises HPLC-DAD-ED dos extractos de agrião escolhidos após análise espectrofotométrica, para identificação de composto fenólicos, foram realizadas com auxílio do grupo de Química Analítica, do ITQB (Oeiras, Portugal), coordenado pela professora Maria do Rosário Bronze. Resumidamente, as análises foram realizadas no equipamento Thermo Finnigan (Modelo Surveyor) equipado com um amostrador automático, detector de díodos (DAD) e detector electroquímico (ED). A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Lichrocart RP-18 column (250 x 4 mm, tamanho de particular 5 μ m, Merck) num forno com termostato a 35°C. O método de análise foi aplicado com um fluxo de 0,700 mL/min e registou-se os perfis cromatográficos a 280, 320 e 360nm. Os eluentes usados foram os seguintes: Eluente A - Ácido fosfórico p.a em água Milli-Q (0.1% v/v) e Eluente B - Acetonitrilo HPLC gradient grade (0% v/v) em ácido fosfórico p.a (0.1% v/v) e água Milli-Q (9.9% v/v). A aquisição e tratamento dos dados realizou-se com recurso ao *software* Chromquest®. Foi realizada a quantificação do teor de polifenóis totais, ácido fenólicos totais e flavonóis totais, em equivalentes de ácido gálico (EAG), em equivalentes de ácido ferulico (EAF) e em equivalente de quercetina (EQ), respectivamente. Os compostos fenólicos foram identificados por comparação dos picos em cada cromatograma, com picos de misturas padrão de composição conhecida.

2.5.5. Identificação de Componentes Químicos presentes nos extractos, por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS)*)

A identificação dos componentes químicos no extracto de agrião por LC-MS foi realizada com o auxílio do grupo de Ciências Toxicológicas e Bromatológicas (Faculdade de Farmácia – Universidade de Lisboa), liderado pela professora Maria do Rosário Bronze. Foi utilizado o equipamento HPLC Waters® Alliance 2695 provido com um detector de díodos (DAD), Waters 2996 (PDA), e um espectrómetro triplo quadrupolo (TQ) (Micromass® Quattro microTM, Waters) com uma fonte ESI em modo negativo. O

capilar foi colocado a 2.5KV e o cone a 35V. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Lichrocart RP-18 column (250 x 4 mm, tamanho de particular 5 µm, Merck). Os eluentes usados foram Eluente A: ácido fórmico (0,5% v/v) e Eluente B: acetonitrilo (LC-MS grade). O programa de eluição contempla a temperatura da coluna a 35 °C, uma pressão máxima de 340 bar e tem duração de 130 min. O fluxo aplicado foi de 0,300 mL/min e o volume de injeção 20,00 µL. Azoto (N₂) ultra-puro foi usado como gás de secagem e como gás de nebulização. Árgon (Ar) ultra-puro foi utilizado como gás de colisão a uma pressão de 1×10^{-4} mbar.

Para a aquisição dos dados recorreu-se ao *software* MassLynx®, versão 4.1.

2.5.6. Identificação e Quantificação de Componentes Químicos presentes nos extractos, por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry* (GC-MS))

Os extractos escolhidos após caracterização espectrofotométrica e consequente constatação de quais os mais ricos em componentes voláteis foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), no laboratório de Química Analítica (ITQB, Oeiras), com o apoio do professor Luís Vilas Boas, a fim de identificar e quantificar os compostos presentes. Recorreu-se a um Cromatógrafo Gasoso Shimadzu GCMS-QP2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com um espectrómetro de massa quadrupolo e fonte impacto electrónico. A separação dos compostos presentes nos extractos foi realizada utilizando uma coluna capilar factor FOUR (Varian Inc.) de 30 m x 0,25 milímetros ID e 0,25 mm de espessura de filme. O programa começou a temperatura da coluna a 35 °C e subiu para 230 °C, com uma taxa de aquecimento de 5 °C / min. A temperatura foi então mantida a 230 °C durante 15 minutos. O fluxo total de gás de transporte, o hélio, foi fixado em 9,0 mL / min. As amostras foram analisadas utilizando dois métodos distintos e comparando os resultados obtidos, entre eles. Num dos métodos, um microlitro de cada amostra foi injectada manualmente com uma microseringa (10 µL, Hamilton Co., Nevada, USA) sem derivatizar (no caso dos extractos de PG somente foi injectado 0,1 µL). A análise foi feita durante 49 min. A temperatura do injector foi de 270 °C e a coluna e o interface de MS foram mantidos a uma temperatura de 250 °C. Na outra metodologia, a amostra foi analisada com fibra. Neste caso, 2 g de agrião, após imersão em azoto líquido e moagem num almofariz, foram acondicionadas e bem seladas em vial de GC. Encaminhou-se o vial ao vortex onde para homogeneização durante 2 min. A fibra (SPME Fiber Assembly, 50/30 µm DVB/ CAR/ PDMS, Stableflex (2cm) 24GA, Supelco Analytical, USA) esteve em contacto com a amostra, a fim de extrair os compostos voláteis no *headspace* do vial por 30 min e em seguida foi auto-injectada no divisor de injeção, com a separação na coluna cromatografia a durar 40 min. As temperaturas do injector, da coluna e do interface de MS foram as mesmas do primeiro método. Em ambos os casos, a detecção por espectrometria de massa foi realizada no modo SCAN e amostras foram examinadas com m/z 29-299. O *software* GCMS Solutions ® foi usado para a aquisição de dados e os componentes dos extractos naturais foram identificados por comparação com os espectros de massa a partir de bibliotecas NIST21, NIST27, NIST107, NIST147 e WILEY229. As áreas de pico foram também calculadas usando o mesmo *software*. Os resultados foram expressos em % áreas relativas dos picos. Por fim testaram-se duas misturas padrão de alcanos para comparar os índices de retenção dos mesmos, com os tempos de retenção na coluna utilizada.

2.6. Actividade Antioxidante

2.6.1. Capacidade de Absorção dos Radicais de Oxigénio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC*)

O ensaio ORAC foi realizado seguindo o procedimento anteriormente relatado por Huang et al. 2002, e modificado para o leitor fluorescente de microplacas FL800 por Feliciano et al. 2008. Sinteticamente, numa microplaca preta de 96 poços adicionou-se a cada poço 25 µl de água/ padrão/ diluições adequadas das amostras e 150 µL de fluoresceína (2×10^{-7} mM). A microplaca foi encaminhada para um leitor de fluorescência de microplacas FLx800 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) com $T = 37^\circ\text{C}$, por 10 min. A reacção ocorreu à mesma temperatura e foi iniciada com a adição através do injector acoplado ao equipamento, a cada poço de 25 µL de AAPH (153 mM). A fluorescência emitida pela forma reduzida da FL foi registada a cada 1 min no comprimento de onda de emissão de 530 ± 25 nm e no comprimento de onda de excitação de 485 ± 20 nm, durante 40 min, sendo controlada pelo *software* Gen5®. Solução salina de tampão fosfato (PBS), 75 mM, pH = 7,4, foi usada como branco e para preparar as soluções de AAPH e de FL. As soluções de 5, 10, 20, 30 e 40 µM de Trolox foram preparadas usando a mesma solução de PBS, e foram utilizadas como padrões na curva de calibração. Todas as amostras, incluindo os padrões de controlo e o branco, foram analisadas em triplicatas. Os valores de ORAC finais foram calculados através de uma equação da recta de regressão linear entre a concentração de Trolox e a área abaixo da curva de FL. Expressaram-se como equivalentes de Trolox por grama de massa fresca (µmol ET / g m.f.).

2.6.2. Capacidade Antioxidante do Radical Hidroxilo (*Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity –HORAC*)

O ensaio HORAC foi baseado num método previamente descrito por Ou et al. 2002, modificado para o leitor fluorescente de microplacas FL800 (Bio- Tek Instruments, Winooski, VT, EUA), como relatado por Serra 2010. Este ensaio avalia a capacidade de prevenção do radical hidroxilo de uma amostra usando fluoresceína (FL) como sonda. O radical hidroxilo foi gerado por uma reacção Co (II) e, de forma semelhante ao teste ORAC, a curva de decaimento da fluorescência de FL foi utilizada para quantificar o valor HORAC. Brevemente, numa microplaca preta de 96 poços adicionou-se 170 µL de FL e 30 µL de acetona: água Milli-Q/ padrão/ diluições adequadas das amostras. Em seguida, 40 µl de H_2O_2 0,206 M, foram adicionados a cada poço da microplaca. Finalmente, a reacção foi iniciada pela adição de 60 µl de fluoreto de cobalto (II) (CoF_2), 1,15 mM. O tampão de fosfato de sódio (SPB), 75 mM, pH = 7,4, foi usado para preparar a solução de FL. As soluções de H_2O_2 e CoF_2 foram preparadas com água Milli-Q. O ácido cafeico em concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 µM em acetona: água Milli-Q (50:50 V / V) foi usado como padrão na determinação da curva de calibração. Para o branco do ensaio recorreu-se à solução de acetona: água Milli-Q (50:50 V / V). A fluorescência emitida pela forma reduzida da FL foi medida e registrada a cada minuto no decorrer de 60 min a 37°C . O leitor de microplacas FLx800 foi controlado pelo *software* Gen5® e foram usados filtros de fluorescência para um comprimento de onda de excitação de 485 ± 20 nm e um comprimento de onda de emissão de 530 ± 25 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicado. Os resultados foram expressos em micromoles de equivalentes de ácido cafeico (µmol EAC) por g de massa fresca.

2.6.3. Capacidade de Eliminação do Radical Hidroxilo (*Hydroxyl Radical Scavenging Capacity – HOSC*)

O ensaio HOSC é um método que mede a capacidade de eliminação das espécies antioxidantes, que estão presentes nas amostras, sobre os radicais hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), utilizando fluoresceína (FL) como sonda. Este ensaio baseou-se no método descrito por Moore et al. 2006 e adaptado para um leitor FLx800 de fluorescência de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA), como descrito por Serra et al. 2013. O radical hidroxilo foi gerado usando uma reacção tipo Fenton $\text{Fe (III)} / \text{H}_2\text{O}_2$ e, tal como verificado nos ensaios de ORAC e HORAC, a curva de decaimento da fluorescência de FL foi utilizada para quantificar o valor de HOSC. Resumidamente, numa microplaca preta de 96 poços adicionou-se 170 μL de FL, 30 μL de acetona: água Milli-Q/ padrão/ diluições adequadas das amostras, seguidos de 40 μL de H_2O_2 (0,1990 M). A reacção foi iniciada pela adição de 60 μL de cloreto de ferro (III) (FeCl_3), 3,43 mM, a cada poço da microplaca. SPB, 75 mM, $\text{pH} = 7,4$, foi usado para preparar a solução de FL, e as soluções de H_2O_2 e FeCl_3 foram preparadas com água Milli-Q. O reagente Trolox foi utilizado como um padrão, e 5, 10, 15, 20 e 30 μM de soluções em acetona: água Milli-Q (50:50 V / V) foram utilizadas para realizar a curva de calibração. A solução de acetona: água Milli-Q (50:50 V / V) foi usada como branco. A fluorescência emitida pela forma reduzida de FL foi medida e registrada a cada 1 minuto, durante 60 minutos a 37 ° C. O leitor de microplacas FLx800 fluorescência foi controlado pelo *software* Gen5®, com um comprimento de onda de excitação de 485 ± 20 nm e um comprimento de onda de emissão de 530 ± 25 nm. Todas as amostras foram analisadas em duplicado, e o ensaio em branco e os controlos em triplicado. Os valores HOSC foram calculados pela equação de regressão entre a concentração de Trolox e a sua área sob a curva de decaimento FL. Estes resultados foram expressos em equivalentes de Trolox por grama de massa fresca (ET $\mu\text{mol} / \text{g m.f.}$).

2.7. Avaliação do potencial para aplicação em cosmética

2.7.1. Ensaios Enzimáticos

2.7.1.1. Actividade da Tirosinase: actividade anti-pigmentante

O ensaio enzimático realizado para o estudo da actividade inibitória da Tirosinase foi determinada através de um método espectrofotométrico descrito por Chan et al. 2008, e modificado para utilizar utilização de L-DOPA como substrato por Lim et al. 2009. Resumidamente, usou-se uma microplaca transparente de 96 poços e a cada um dos poços adicionou-se 80 μL de tampão fosfato, 40 μL de tirosinase e 40 μL de L-DOPA. Uma solução 50% DMSO foi utilizada como controlo negativo e uma solução de ácido Kójico (1mg/ mL) foi utilizada como controlo positivo. A placa foi a incubar a 37 ° C durante 30 min, Leu-se a absorvância a 475 nm num espectrofotómetro de placas (Powerwave XS, Biotek, Winooski, EUA). A percentagem de inibição da tirosinase foi calculada segundo a equação 2.3..

$$\text{Inibição da tirosinase (\%)} = \frac{A_{\text{contolo}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{contolo}}} \times 100$$

Equação 2.3. – Fórmula para determinação da percentagem de inibição da tirosinase

2.7.1.2. Inibição da Metaloproteínase (MMP) 1: actividade anti-rugas

O ensaio de inibição de MMP-1 por hidrólise do substrato foi adaptado dos trabalhos reportados por Shimokawa Ki et al. 2002 e Kim et al. 2006. Resumidamente, para a determinação da actividade anti-rugas dos extractos de agrião utilizou-se uma placa transparente de 96 poços, sendo que a cada poço se adicionou 93 µL de tampão Tris-HCl/ 88 µL de tampão Tris-HCl + 5 µL de amostra (diluída ½ em Tris-HCl) / 88 µL de tampão Tris-HCl + 5 µL EDTA, 2 µL de enzima (500 ng/ mL) / 2 µL de solvente de reconstituição da enzima (para controlo sem enzima), 5 µL de substrato MMP Fluorogénico 1 µM. A placa vai a incubar numa estufa a 37 °C durante 20h. A intensidade da fluorescência é lida num leitor de fluorescência de microplacas FLx800 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) com Ex/Em=340/440 nm e sensibilidade=55. Os resultados são apresentados em % de inibição da enzima MMP-1, utilizando equação semelhante à 2.2.

2.7.2. Estudo de Absorção Cutânea com a Célula de Franz

Um dos métodos mais utilizados para estudar a permeação *in vitro* é a Célula de difusão de Franz. Esta célula tem sido aplicada em vários estudos de permeação cutânea, incluindo formulações de libertação transdérmicas e tópicas, como cosméticos. O ensaio foi desenvolvido tendo como base o trabalho realizado por Franz (1975). Resumidamente, encheu-se a célula de Franz (PermeGear Inc., Hellertown, EUA) com PBS adicionou-se um agitador magnético e colocou-se uma membrana Strat-M™. Na parte superior da membrana adicionou-se 2 mL de extracto. A célula foi mantida num banho termostaticado de modo a que no seu interior se registasse uma temperatura de 34 °C, com agitação constante. A cada hora (durante as primeiras 8 horas mais um ponto às 24 horas), retirou-se aproximadamente 200 µL pelo braço lateral com uma seringa e repôs-se o volume retirado com adição de PBS. A quantificação da absorção do ácido p-cumárico de modo a se efectivar se ocorreu absorção do extracto pela membrana, foi realizada por MRM Monitorização de Reacção Múltipla (MRM). Esta técnica acoplada a espectrometria de massa, utilizando um espectrómetro de massa de quadrupolo triplo é um método poderoso para a quantificação de compostos.

3. Resultados e Discussão

O agrião seleccionado para este estudo, foi plantado e colhido pela Vitacress, no concelho de Odemira. Esta matriz foi inicialmente caracterizada, realizando-se três extracções, cada uma delas com a finalidade de obtenção de compostos-alvo específicos (compostos fenólicos, terpenos e carotenóides). Os extractos obtidos foram caracterizados em termos de composição fitoquímica por métodos espectrofotométricos [polifenóis totais (PT), terpenos totais (TT) e carotenóides totais (CT)] (secção 3.1.). Com o objectivo de extrair estes compostos bioativos e otimizar um processo de extracção utilizando "tecnologias limpas", foi elaborado um desenho de experiências com as variáveis temperatura (20-80 °C), razão matriz:solvente (1:2-1:6) e razão água:solvente (0-1), fixando a agitação a 750 rpm e o tempo de extracção de 1h. Este desenho de experiências foi concretizado, utilizando dois solventes GRAS, etanol e propilenoglicol, num total de 26 experiências definidas pelo software (11 ensaios utilizando etanol/etanol:água, 11 ensaios utilizando propilenoglicol/ propilenoglicol:água e 4 ensaios utilizando água, comuns aos dois design's). Os extractos obtidos nas 26 experiências do DOE (tabela 2.2.) foram caracterizados e quantificados em termos de polifenóis totais, terpenos totais (somente determinados nos extractos do DOE EtOH:H₂O, pelo facto do PG reagir com a solução de vanilina:H₂SO₄, formando uma mistura negra e viscosa (figura 3.1.) que impossibilitou a leitura no espectrofotómetro) e carotenóides totais, que devido à insolubilidade do hexano (solvente do método), com os solventes de extracção estudados, não permitiu a aplicação directa da metodologia nos extractos, sendo necessário proceder a extracções numa ampola de decantação (com hexano). Somente foi possível realizar a quantificação de carotenóides nos extractos com 100% PG adicionado (PG 4, PG 5, PG 13 e PG 14), facto que pode ser justificado pelo carácter lipofílico destes compostos.

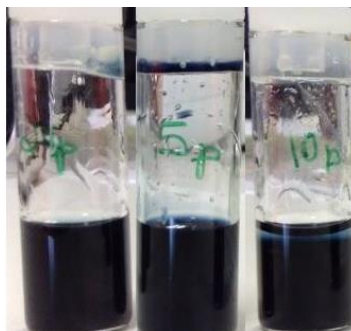


Figura 3.1. – Solução final após reacção do PG com 2% vanilina:H₂SO₄

A caracterização espectrofotométrica e de fluorescência (actividade antioxidante) do DOE EtOH:H₂O e do DOE PG:H₂O encontram-se nas secções 3.2. e 3.3., respectivamente. Considerando os resultados obtidos nos ensaios anteriores (PT, TT, ORAC, HORAC e HOSC), foram escolhidos os melhores extractos com base no rendimento em polifenóis totais, terpenos totais e actividade antioxidante, para serem caracterizados por métodos cromatográficos (LC-MS, HPLC-DAD-ED e GC-MS)(secção 3.4.) e para avaliar-se o potencial para aplicação cosmética, em função de actividade enzimática e da absorção cutânea *in vitro* (secção 3.5.).

3.1. Caracterização da Matriz

A matriz agrião foi caracterizada, no que diz respeito às três famílias de compostos-alvo. Para tal, e considerando trabalhos anteriormente realizados, foram escolhidos três métodos de extração, descritos na secção 2.3.. Cada um dos extractos foi quantificado espectrofotometricamente, de acordo com a sua finalidade (tabela 3.1.).

Tabela 3.1. – Caracterização espectrofotométrica dos extractos considerando os compostos-alvo em estudo

Extracto ^(c)	Polifenóis Totais (mg EAG/ g m.f.)	Terpenos Totais (mg EL/ g m.f.)	Carotenóides Totais (mg Eβ-C/100 g m.f.)
ExtPT	0,81	-	-
ExtTT	-	0,29	-
ExtCT	-	-	4,41

^(c) A identificação dos extractos foi feita de acordo com os seus compostos-alvo ExtPT - extracto para caracterização do agrião em função do teor de polifenóis totais; ExtTT - extracto para caracterização do agrião em função do teor de terpenos totais; ExtCT - extracto para caracterização do agrião em função do teor de carotenóides totais.

Comparando os resultados obtidos com quantificações descritas na literatura, o valor de polifenóis totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu situou-se dentro da gama de valores reportados por Hassimotto et al. 2005, Lako et al. 2007 e Isabelle et al. 2010 (0,54 - 1,86 mg EAG/ g m.f.). No que respeita ao valor calculado para carotenóides totais, O'Neill et al. em 2001 determinou 5,919 mg E β -C/ 100 g m.f., valor bastante semelhante ao estimado neste estudo. Apesar de não existirem outros valores reportados de carotenóides obtidos por determinação espectrofotométrica, foi possível comparar com outros vegetais da mesma família. Em 2012, Stewart et al. quantificaram para bróculos 2,85 mg E β -C/ 100 g m.f. e para couve-flor 0,44 mg E β -C/ 100 g m.f.. Dados relativos à rúcula indicam 8,84 \pm 1,45 mg E β -C/ 100 g m.f. (Znidarcici, et al. 2011) e 1,62 mg E β -C/ 100 g m.f. (Villadoro-Pulido, 2013). Analisando estes valores, verificou-se que o agrião possui uma matriz mais rica em carotenóides do que os bróculos e a couve-flor; a rúcula, fisionomicamente mais semelhante à matriz estudada, apresenta teor mais elevado de carotenóides, que as duas *Brassica oleracea* e que o agrião. Em relação à quantificação espectrofotométrica de terpenos totais no agrião, não existe qualquer dado na bibliografia que permita comparação.

3.2. DOE EtOH:H₂O

No DOE EtOH:H₂O, os resultados de polifenóis totais obtidos pelo método de Folin Cicoalteu variaram entre 0,54 e 1,22 mg EAG/ g m.f.. Na quantificação espectrofotométrica de terpenos totais, os valores obtidos oscilaram entre 0,04 e 0,15 mg EL/ g m.f.. No que respeita ao cálculo da actividade antioxidante, pelos três métodos previamente enunciados, os resultados alternaram entre 11,25 e 17,58 μ mol ET / g m.f., 2,84 e 11,64 μ mol EAC / g m.f. e 10,56 e 16,45 μ mol ET / g m.f., para ORAC, HORAC e HOSC, respectivamente. Todos os resultados encontram-se discriminados na tabela 3.2.

Tabela 3.2. – Valores de Polifenóis Totais, Terpenos Totais, ORAC, HORAC e HOSC, determinados para o DOE EtOH:H₂O

Condição	Extracto	Polifenóis Totais (mg EAG/ g m.f.)	Terpenos Totais (mg EL/ g m.f.)	Carotenóides Totais (mg Eβ-C/100 g m.f.)	ORAC (μmol ET / g m.f.)	HORAC (μmol EAC / g m.f.)	HOSC (μmol ET g m.f.)
6	H ₂ O 6	0,82	0,11	nd	15,30	7,35	13,98
7	H ₂ O 7	1,22	0,09	nd	15,74	11,64	15,58
8	H ₂ O 8	0,84	0,08	nd	14,57	7,51	12,10
11	H ₂ O 11	0,80	0,08	nd	14,42	5,72	10,85
1	EtOH: H ₂ O 1	1,08	0,10	nd	13,99	5,74	13,51
2	EtOH: H ₂ O 2	0,97	0,12	nd	15,08	5,74	11,99
3	EtOH: H ₂ O 3	0,5	0,04	nd	12,30	4,48	10,56
4	EtOH 4	0,54	0,06	nd	12,55	3,55	11,15
5	EtOH 5	0,87	0,15	nd	12,58	4,16	10,65
9	EtOH: H ₂ O 9	1,07	0,10	nd	13,90	5,85	14,33
10	EtOH: H ₂ O 10	0,77	0,04	nd	11,25	5,49	10,59
12	EtOH: H ₂ O 12	1,07	0,09	nd	14,04	5,64	13,75
13	EtOH 13	1,11	0,15	nd	15,15	5,62	16,45
14	EtOH 14	1,01	0,08	nd	14,97	2,84	12,09
15	EtOH: H ₂ O 15	1,07	0,10	nd	17,58	6,14	13,67

nd: não determinado

Os resultados exibidos na tabela anterior foram tratados estatisticamente, de acordo com o descrito na secção 2.4.1. Para visualizar as relações entre as respostas obtidas e as variáveis estudadas, foram estimados os efeitos, lineares e quadráticos, de cada factor e as suas interacções. A tabela 3.3. mostra o efeito linear e quadrático de cada variável e das interacções sobre o teor de PT, TT, ORAC, HORAC e HOSC para este desenho de experiências.

Tabela 3.3. - Efeitos Linear (L) e Quadrático (Q) e respectivos valores de significância (*p value*) dos factores estudados [temperatura (X₁), razão matriz:solvente (X₂) e razão água:co-solvente (X₃)] e interacções sobre o teor de PT, TT, ORAC, HORAC e HOSC, para o DOE EtOH:H₂O

Factor	Polifenóis Totais		Terpenos Totais		ORAC		HORAC		HOSC	
	Efeito	<i>p</i> value	Efeito	<i>p</i> Value	Efeito	<i>p</i> value	Efeito	<i>p</i> Value	Efeito	<i>p</i> value
X ₁ (L)	0,84	9,74E-04 ^a	0,09	7,47E-02 ^b	14,33	8,51E-02 ^b	5,69	2,07E-02 ^a	12,33	1,82E-04 ^a
X ₁ (Q)	0,35	4,94E-02 ^a	0,05	8,61E-01	2,65	4,51E-01 ^b	2,22	2,38E-01 ^b	2,87	3,49E-01 ^b
X ₂ (L)	0,09	2,19E-02 ^a	0,003	6,49E-01	-0,71	7,33E-01	-0,63	1,99E-01 ^b	-0,21	6,88E-01
X ₂ (Q)	0,16	3,16E-03 ^a	-0,01	5,89E-01 ^b	0,42	6,69E-01	-0,93	9,63E-02 ^b	0,12	4,93E-05 ^a
X ₃ (L)	0,20	9,75E-01	0,01	6,42E-01	0,42	4,95E-01 ^b	1,01	1,67E-03 ^a	2,78	5,09E-01 ^b
X ₃ (Q)	0,00	2,54E-02 ^a	0,01	3,49E-01 ^b	-0,86	5,38E-01	-3,86	2,83E-01 ^b	-0,20	1,51E-01 ^b
X ₁ X ₂	0,11	6,98E-02 ^b	-0,02	4,32E-01	-0,55	7,48E-01	-0,54	5,12E-01 ^b	-0,33	1,18E-02 ^a
X ₁ X ₃	-0,16	2,36E-02 ^a	0,03	1,35E-01 ^b	-0,57	5,21E-01	-0,64	2,46E-01	-1,53	4,03E-03 ^a
X ₂ X ₃	0,20	1,37E-02 ^a	0,06	4,13 E-01 ^b	1,08	4,06E-01 ^b	-1,11	4,80E-01	1,85	1,03E-02 ^a

^a Efeitos significativos com *p* ≤ 0.05^b Efeitos com *p* > 0.05 considerados no modelo

Relativamente aos resultados obtidos para os PT, X_1 foi o parâmetro que mostrou apresentar um maior efeito, indicando que dentro da gama de temperaturas estudadas, uma temperatura mais elevada traduz-se na extracção de maior quantidade de compostos fenólicos; além disso, observou-se que a interacção entre a temperatura de extracção e a razão matriz:solvente ($X_1 \times X_2$) possui um efeito positivo, mostrando que a temperatura de extracção influencia distintamente o rendimento de extracção, para diferentes razões g matriz/ volume solvente, sendo maior para o nível 0 de X_2 (5g/ 20 mL) e $T=80^\circ\text{C}$. Contrariamente, a interacção $X_1 \times X_3$ (temperatura e razão água:co-solvente) possui efeito negativo. Observou-se que utilizando uma solução hidroalcoólica EtOH:H₂O (1:1), a temperaturas mais baixas (20 °C ou 50 °C) conduziu à obtenção de teores de polifenóis elevado (condições 1, 9 e 12). Este facto pode ser justificado uma vez que, a extracção de proteínas é favorecida a temperaturas mais baixas usando uma solução hidroalcoólica com mais de 50% de água (no caso do agrião fresco, o teor de água na matriz de $\approx 95\%$, dilui a mistura de 1:1 etanol:água. As proteínas extraídas nestas condições podem causar interferência no método espectrofotométrico com o reagente de Folin-Ciocalteu (Shi et al. 2003). Os efeitos quadráticos positivos indicaram que os resultados experimentais na quantificação de polifenóis totais deste DOE podem ser representados por superfícies côncavas de quatro dimensões (figura 3.2. i.).

No que respeita aos valores de TT não foram encontrados efeitos lineares significativos. A temperatura surgiu como o parâmetro que mais influenciou a extracção de terpenos verificando-se que para $T=80^\circ\text{C}$, o rendimento neste tipo de compostos é maior, mesmo podendo ocorrer degradação e perda de compostos com esta temperatura elevada. Os efeitos quadráticos positivos significativos de X_2 e X_2^2 indicam que a quantificação espectrofotométrica de terpenos neste desenho de experiências, pode ser descrita por quatro superfícies côncavas (figura 3.2. ii.). Quando comparando os valores de terpenos obtidos para o DOE, com o valor de TT da extracção soxhlet para caracterização da matriz, este último foi bastante superior. Tal facto ocorre uma vez que a extracção soxhlet é mais indicada para a obtenção de extractos ricos em compostos voláteis, e consequentemente terpenos, em comparação com as extracções realizadas no DOE.

Quanto aos valores de ORAC, foram encontrados efeitos negativos para X_2 linear indicando que à medida que a razão matriz:solvente aumenta, a actividade antioxidante diminui. Por seu lado, a temperatura tem um efeito bastante positivo, significando que quando X_1 aumenta, o valor de ORAC aumenta. De um modo geral, concluiu-se que a utilização de água como solvente, X_3 no nível -1, maximiza a actividade antioxidante. A interacção $X_2 \times X_3$ também demonstrou ter um efeito positivo, sendo que, o valor de ORAC é maior, quanto menor for a razão matriz:solvente (1:6) e maior for a % de H₂O na mistura extractora. O efeito quadrático positivo significativo da temperatura indicou que o valor de ORAC pode ser descrito por duas superfícies de resposta côncavas (figura 3.2. iii.).

Em relação aos valores de HORAC, X_2 (L) e (Q), X_3 (Q) e todas as interacções estudadas, são descritas por efeitos negativos. No caso de X_2 (L), tal como se verificou no ORAC, quanto menor for a quantidade de solvente utilizada na extracção de 5 g de agrião, menor é o valor de HORAC. X_2 (Q) e X_3 (Q), traduzem-se em superfícies de resposta dimensionais convexas (figura 3.2. iv.). Mais uma vez, X_1 linear apresentou um efeito positivo mais significativo, indicando que um aumento de temperatura maximiza os valores de HORAC.

Finalmente, para os resultados HOSC os efeitos são bastante semelhantes aos analisados para HORAC, com excepção de X_2 quadrático e da interação de X_2 com X_3 . A temperatura continuou a influenciar positivamente, tal como já tinha sido verificado para as respostas anteriores. Os efeitos quadráticos positivos significativos de X_1 e X_2 indicam que os resultados de HOSC para este DOE, podem ser descritos por quatro superfícies côncavas (figura 3.2. v.). Observou-se que das condições de extracção avaliadas para a obtenção de extracto com actividade antioxidante mais elevada, X_2 de 5g/ 20 mL é a condição óptima para qualquer razão X_3 .

Os modelos polinomiais de segunda ordem que descrevem o modelo em função das respostas PT, TT, ORAC, HORAC e HOSC, estão descritas na tabela 3.4.

Tabela 3.4. - Equações do modelo para as superfícies de resposta de PT, TT, ORAC, HORAC e em função dos factores estudados [temperatura (X_1), razão matriz:solvente (X_2) e razão água:co-solvente (X_3)] e respectivos R^2 and R_{ajust}^2 , para o DOE EtOH:H₂O

Equações polinomiais do modelo	R^2	R_{adj}^2
$PT = -0,64 + 0,018X_1 + 6,993X_2 - 9,469X_2^2 - 0,577X_3^2 - 0,015X_1X_2 + 0,005X_1X_3 + 1,014X_2X_3$	0,958	0,903
$TT = 0,063 + 0,0002X_1 + 0,099X_2^2 + 0,030X_3^2 - 0,001X_1X_3 - 0,231X_2X_3$	0,647	0,450
$ORAC = 14,60 - 0,054X_1 + 0,001X_1^2 - 2,160X_3 + 3,309X_2X_3$	0,571	0,399
$HORAC = 3,49 - 0,021X_1 + 0,001X_1^2 + 26,991X_2 - 45,078X_2^2 - 4,134X_3 + 1,972X_3^2 - 0,037X_1X_3$	0,925	0,851
$HOSC = 16,85 - 0,116X_1 + 0,001X_1^2 - 18,982X_2^2 - 7,966X_3 + 0,984X_3^2 + 0,050X_1X_2 + 0,062X_1X_3 + 11,506X_2X_3$	0,985	0,967

Nestes modelos de RSM, foram incluídos nas equações do modelo destas superfícies os efeitos significativos com p value <0,05. Também foram aceites alguns factores com valores de p value superiores a 0,05, sendo que esta acção foi tomada para não se correr o risco de ignorar um factor que pode ser expressivo nas determinações efectuadas. Resultados de R^2 e R_{ajust}^2 elevados para PT, HORAC e HOSC sugerem uma estreita concordância entre os dados experimentais e os valores teóricos previstos pelo modelo. Nos casos de TT e ORAC, o coeficiente de correlação e o coeficiente de correlação ajustados foram $\leq 0,65$, revelando menor concordância com os valores esperados pelo RSM. Na figura 3.2. podem ser observados gráficos que permitem a identificação das melhores condições nas superfícies.

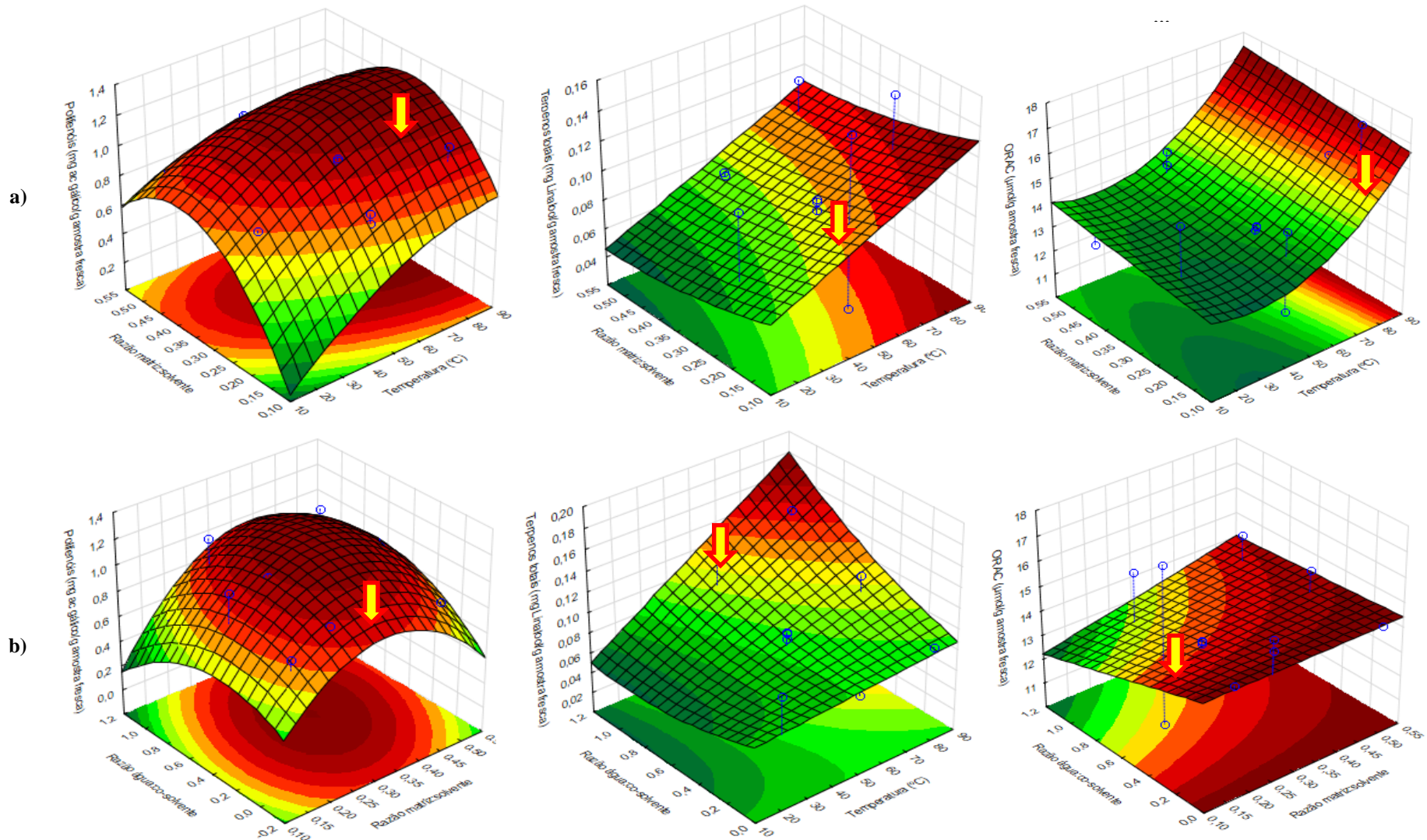


Figura 3.2. – Superfícies de Resposta (DOE EtOH:H₂O) ajustadas para o teor em Polifenóis Totais (i.), o teor em Terpenos Totais (ii.) e a actividade antioxidante pelos métodos ORAC (iii.), HORAC (iv.) e HOSC (v.), em função das 2 combinações a) e b) de respostas mais favoráveis (↓ indica a localização da melhor condição obtida experimentalmente para cada interação, em cada superfície)

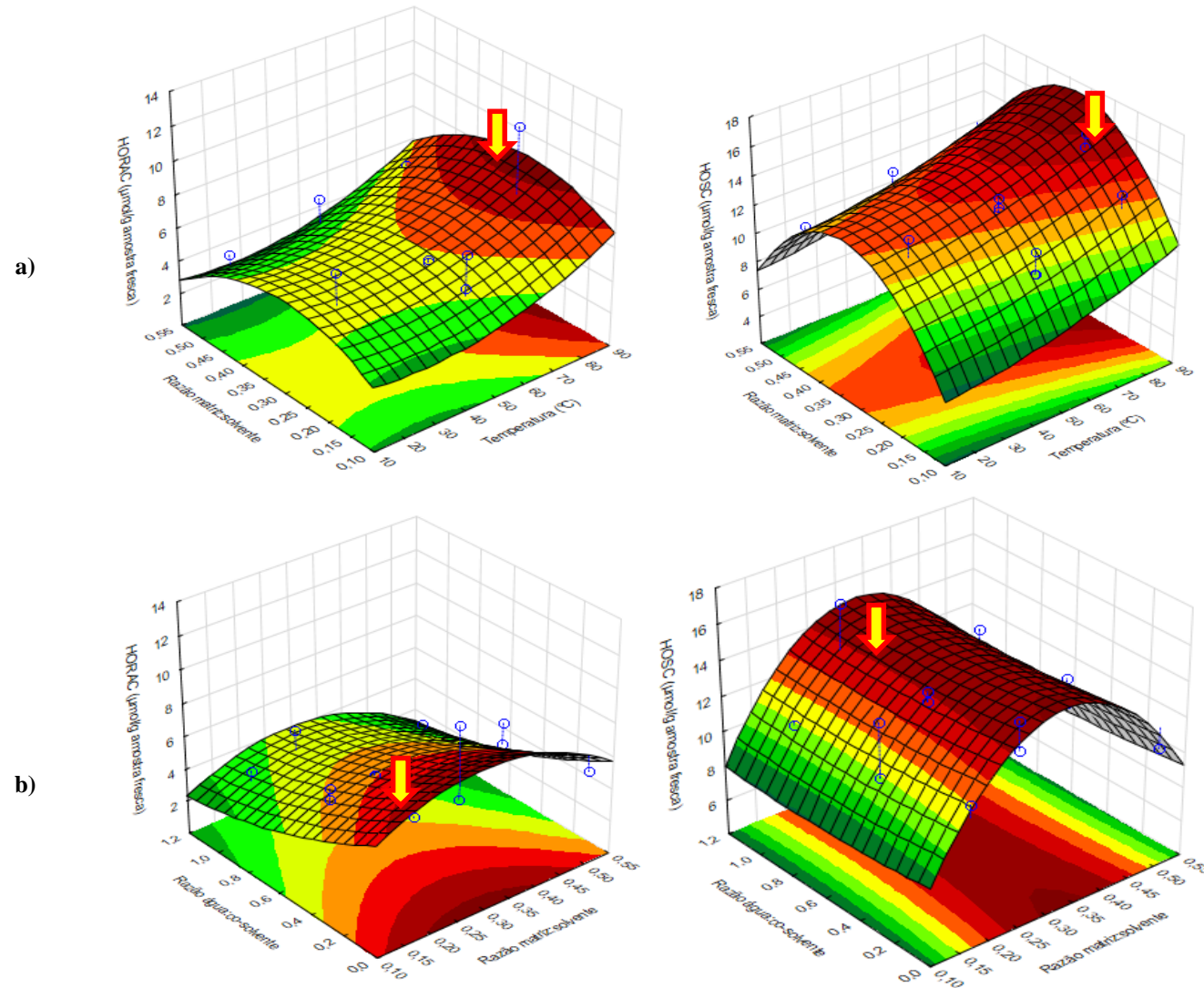


Figura 3.2. – Superfícies de Resposta (DOE EtOH:H₂O) ajustadas para o teor em Polifenóis Totais (i.), o teor em Terpenos Totais (ii.) e a actividade antioxidante pelos métodos ORAC (iii.), HORAC (iv.) e HOSC (v.), em função das 2 combinações a) e b) de respostas mais favoráveis (↴ indica a localização da melhor condição obtida experimentalmente para cada interacção, em cada superfície) (continuação)

A análise dos gráficos escolhidos (interacções a) e b)) para cada uma das respostas, permitiu concluir sobre as condições mais favoráveis para a obtenção de extractos ricos em PT, TT, ORAC, HORAC e HOSC. Na tabela 3.5. estão representadas as condições fornecidas pelas superfícies de resposta, onde se observou valor máximo para essas mesmas respostas (zonas a **vermelho escuro**).

Tabela 3.5. – Condições de temperatura (X_1), razão matriz:solvente (X_2) e razão água:co-solvente (X_3) mais favoráveis definidas a partir da observação das superfícies de resposta ajustadas para o teor em PT, TT, ORAC, HORAC e HOSC (DOE EtOH:H₂O)

Respostas	Melhores condições das Superfícies de Resposta		
	Temperatura (X_1)	Razão Matriz:Solvente (X_2)	Razão H ₂ O: EtOH (X_3)
PT	≈ 85 °C	1:4 ^{a)} 1:2,5 ^{b)}	1:1
TT	80 °C	1:7	0:1
ORAC	≈ 85 °C	1:2,5 ^{a)} Qualquer razão ^{b)}	0:1
HORAC	50 °C	1:4	0:1
HOSC	80 °C	1:4	Qualquer razão

^{a)} Condição mais favorável retirada da interacção a)

^{b)} Condição mais favorável retirada da interacção b)

Considerando os valores representados na tabela 3.5 foi possível comparar com as condições óptimas experimentais. Recordando a condição deste DOE que possuiu valores de PT mais elevados, H₂O 7, esta extracção foi realizada a 80 °C, com 20 mL de água (razão matriz:solvente = 1:4 e razão água:co-solvente 0:1). A comparação entre os valores, e a representação no gráfico das condições de extracção de H₂O 7, permitiu verificar que estas situam-se na zona vermelha (ótima) em ambas as interacções. Para a resposta TT, das extracções elaboradas com este DOE, EtOH 5 foi aquela que revelou maior teor em terpenos totais, e foi preparada com 100% EtOH, T= 50 °C e razão matriz solvente de 1/6. Comparando estas informações, verificou-se ligeira discordância entre os dados fornecido pelo modelos e os determinados experimentalmente. No caso dos valores de ORAC, os resultados experimentais indicaram que o extracto EtOH: H₂O 15 foi aquele que teve ORAC mais elevado, sendo obtido com T= 80 °C, EtOH: H₂O (1:1) e razão razão matriz:solvente = 1:4. Mais uma vez se concluiu haver discordâncias entre os resultados do modelo e os obtidos experimentalmente. No entanto, a sinalização da condição 15 nos gráficos de ORAC permitiu visualizar que estas se situam no limite da zona laranja com a zona vermelha. Para os resultados da resposta HORAC, tal como para PT, também neste caso o extracto H₂O 7 teve valores mais elevados de HORAC e somente a temperatura a que foi realizado este extracto foi diferente das condições indicadas pelo modelo, o que se comprova aquando da sinalização das condições de extracção de H₂O 7 nas superfícies desta resposta (zona vermelha em ambas as interacções). Para finalizar, experimentalmente o valor de HOSC foi máximo no extracto EtOH 13 preparado com 100% EtOH, T= 80 °C e 1:4 de matriz:solvente. Comparando com os dados fornecidos pelo modelo, estes sugerem concordância com os resultados experimentais.

3.3.DOE PG:H2O

As extracções elaboradas com o DOE de PG:H2O também foram caracterizadas. Obtiveram-se valores de polifenóis totais com resultados entre 0,74 e 1,55 mg EAG/ g m.f.. A actividade antioxidante dos extractos deste DOE, determinada com o método de ORAC, resultou em valores entre 12,17 e 39,31 $\mu\text{mol ET/ g m.f.}$, os resultados de HORAC variaram entre 5,29 e 14,36 $\mu\text{mol EAC / g m.f.}$ e os de HOSC variaram entre 10,46 e 28,97 $\mu\text{mol ET/ g m.f.}$ Tal como já foi referido, não foi possível quantificar terpenos em extractos contendo PG. Também como já foi afirmado, no que respeita à quantificação de carotenóides, somente se determinaram valores para os extractos com X3 no nível +1, (100% PG adicionado) devido ao carácter lipídico deste solvente. Os valores de carotenóides totais dos extractos que foram possíveis analisar, encontram-se entre 0,016 e 1,906 mg E β -C/ 100 g m.f.. Para além da influência do solvente, já abordada, constatou-se que uma maior razão matriz:solvente favoreceu a extracção dos carotenóides (X2 = 1:6). A temperatura de 50 °C foi mais favorável à extracção destes fitoquímicos, comparando com T = 80 °C, uma vez que nesta ultima, provavelmente, ocorre degradação térmica dos carotenóides do agrião. As respostas calculadas para o DOE PG:H2O encontram-se sumarizadas na tabela 3.6..

Tabela 3.6. – Valores de Polifenóis Totais, Terpenos Totais, ORAC, HORAC e HOSC, determinados para o DOE PG:H2O

Condição	Extracto	Polifenóis Totais (mg EAG/ g m.f.)	Terpenos Totais (mg EL/ g m.f.)	Carotenóides Totais (mg E β -C/100 g m.f.)	ORAC ($\mu\text{mol ET / g m.f.}$)	HORAC ($\mu\text{mol EAC / g m.f.}$)	HOSC ($\mu\text{mol ET g m.f.}$)
6	H ₂ O 6	0,82	0,11	nd	15,30	7,35	13,98
7	H ₂ O 7	1,22	0,09	nd	15,74	11,64	15,58
8	H ₂ O 8	0,84	0,08	nd	14,57	7,51	12,10
11	H ₂ O 11	0,80	0,08	nd	14,42	5,72	10,85
1	PG: H ₂ O 1	1,49	nd	nd	27,59	8,72	16,31
2	PG: H ₂ O 2	1,34	nd	nd	25,56	9,12	14,06
3	PG: H ₂ O 3	0,74	nd	nd	12,17	5,97	10,46
4	PG 4	1,01	nd	0,02	26,56	5,29	17,54
5	PG 5	1,28	nd	1,91	27,38	10,09	25,26
9	PG: H ₂ O 9	1,51	nd	nd	29,15	9,86	18,69
10	PG: H ₂ O 10	1,26	nd	nd	36,52	9,39	15,25
12	PG: H ₂ O 12	1,51	nd	nd	24,73	10,31	18,64
13	PG13	1,55	nd	0,96	39,31	14,36	28,97
14	PG14	1,53	nd	0,02	21,02	6,85	11,63
15	PG: H ₂ O 15	1,43	nd	nd	33,44	11,39	25,15

nd: não determinado

No tratamento estatístico dos resultados de polifenóis totais e da actividade antioxidante, actuou-se de igual forma ao realizado para o DOE EtOH:H₂O. O efeito linear e quadrático de cada variável e suas interacções sobre o teor de Polifenóis Totais, ORAC, HORAC e HOSC encontram-se discriminados na tabela 3.7..

Tabela 3.7. - Efeitos Linear (L) e Quadrático (Q) e respectivos valores de significância (*p value*) das variáveis testadas [factores: temperatura (X_1), razão matriz:solvente (X_2) e razão água:co-solvente (X_3)] e interações sobre o teor de PT, ORAC, HORAC e HOSC, para o DOE PG:H₂O

Factor	Polifenóis Totais		ORAC		HORAC		HOSC	
	Efeito	<i>p</i> value	Efeito	<i>p</i> value	Efeito	<i>p</i> value	Efeito	<i>p</i> Value
X₁ (L)	0,44	1,70E-05 ^a	9,13	6,82E-02 ^b	5,15	1,64E-03 ^a	6,01	7,72E-03 ^a
X₁ (Q)	0,12	1,50E-03 ^a	-0,22	9,41E-01	-0,18	7,75E-01	-1,52	1,84E-01 ^b
X₂ (L)	-0,17	1,30E-03 ^a	-9,10	5,85E-02 ^b	-1,87	6,41E-02 ^b	-6,96	3,29E-03 ^a
X₂ (Q)	0,22	1,05E-04 ^a	0,72	8,16E-01	1,34	8,37E-02 ^b	1,43	2,27E-01 ^b
X₃ (L)	0,28	1,03E-04 ^a	12,44	2,05E-02 ^a	1,02	2,55E-01 ^a	6,26	5,16E-03 ^a
X₃ (Q)	0,28	2,13E-05 ^a	5,10	1,11E-01 ^b	0,31	6,09E-01	-0,35	7,22E-01
X₁xX₂	0,16	6,68E-03 ^a	3,98	4,91E-01	-1,66	2,06E-01 ^b	-2,88	1,91E-01 ^b
X₁xX₃	0,19	2,79E-03 ^a	6,16	2,73E-01 ^b	2,39	7,41E-02 ^b	4,92	3,93E-02 ^b
X₂xX₃	-0,17	3,26E-03 ^a	-4,47	3,86E-01 ^b	-0,31	7,72E-01	-5,84	1,75E-02 ^a

^a Efeitos significativos com $p \leq 0.05$ ^b Efeitos com $p > 0.05$ considerados no modelo

Tal como se procedeu na análise do DOE EtOH:H₂O, para a elaboração dos modelos foram considerados alguns factores com valores de *p* superiores a 0,05 de modo a evitar-se a renúncia de factores que de algum modo influenciam os resultados finais. A interpretação dos resultados representados na tabela anterior permitiu concluir sobre a influência das variáveis nas respostas.

Os valores de PT para o DOE PG:H₂O possuem um efeito linear positivo significativo da variável temperatura (X_1), o que indicou que quanto maior a temperatura dentro da gama de temperaturas testadas, maior é o valor de PT nos extractos. O mesmo efeito foi observado para a razão água:co-solvente mostrando que um aumento da % de PG utilizado conduz a um aumento de PT. O efeito linear negativo de X_2 exibiu que a razão matriz:solvente de 1:2, i.e., 5g agrião/ 10 mL de solvente, foi aquela com que se obteve menores resultados de PT. Os efeitos quadráticos positivos das 3 variáveis indicaram que os resultados de PT para este DOE, podem ser descritos por superfícies côncavas, das quais as duas melhores podem ser visualizadas na figura 3.3. i.. Os resultados das interações entre variáveis são ótimos para T=80 °C e volume de solvente = 20 mL, para T=80 °C e razão $X_3 \geq$ PG:H₂O (1:1) ou para volume de solvente = 20 mL e razão $X_3 \geq$ PG:H₂O (1:1).

No que respeita aos valores de ORAC, o efeito mais significativo foi aquele associado a X_3 linear, ou seja, para se conseguirem maiores valores de ORAC a variável com maior influência é a razão água:co-solvente, sendo que, para extracções realizadas com 100% PG esta resposta de actividade antioxidante foi mais elevada. Também a temperatura possuiu um efeito linear positivo, significando que utilizando temperaturas de extracção mais elevadas, o valor de ORAC do extracto foi maior. A resposta X_2 voltou a exibir efeito linear negativo, significando que ORAC foi menor para menores volumes de solvente. A interacção de X_1 com X_3 apresentou valores de ORAC máximos para T=80 °C e 100% PG adicionado e X_2 x X_3 com 30 mL PG adicionado resultou em valores de ORAC maiores para esta interacção. Somente se

considerou o efeito quadrático de X_3 como significativo, indicando que esta resposta pode ser descrita por duas superfícies côncavas (figura 3.3. ii.).

Quanto aos resultados de HORAC, todas as respostas lineares foram em tudo semelhantes ao constatado para o ORAC. Desta feita, só se considerou como significativo o efeito quadrático de X_2 , resultando na representação da resposta por duas superfícies côncavas (figura 3.3. iii.). Contrariamente ao que se analisou para ORAC, a interação $X_2 \times X_3$ apresentou valores de HORAC maiores para 20 mL PG adicionado.

Por fim, nos valores determinados para o HOSC, a temperatura voltou a ter efeito linear significativo positivo, indicando o mesmo que já se afirmou nas restantes respostas. Também a razão matriz:solvente se comportou da mesma forma para as quatro respostas deste DOE. O mesmo aconteceu com X_3 , que mais uma vez indicou que os valores de HOSC são mais elevados se $X_3 \geq \text{PG:H}_2\text{O}$ (1:1). Os efeitos positivos das quadráticas indicaram que os resultados experimentais na quantificação de HOSC deste DOE podem ser representados por seis superfícies côncavas de quatro dimensões (figura 3.2. iv.).

Os gráficos de superfície de resposta fornecidos pelo *software* podem ser vistos na figura 3.3 (com indicação de em que zona da superfície, i.e., com que condições foi obtida resposta máxima para a gama de condições estudadas), e as equações polinomiais quadráticas para as respostas estão representadas na tabela 3.8..

Tabela 3.8. - Equações do modelo para as superfícies de resposta de PT, ORAC, HORAC e em função das variáveis testadas [factores: temperatura (X_1), razão matriz:solvente (X_2) e razão água:co-solvente (X_3)] e respectivos R^2 and R_{ajust}^2 , para o DOE PG:H₂O

Equações polinomiais do modelo	R^2	R_{adj}^2
$PT = -0,35 + 0,012X_1 + 6,308X_2 - 10,673X_2^2 + 1,428X_3 - 1,114X_3^2 + 0,016X_1X_2 + 0,006X_1X_3 - 1,025X_2X_3$	0,995	0,987
$ORAC = 16,99 + 0,041X_1 - 13,761X_2 + 30,265X_3 + 0,205X_1X_3 - 26,840X_2X_3$	0,859	0,754
$HORAC = 8,28 + 5,224X_1 - 1,803X_2 + 1,380X_2^2 + 1,093X_3 - 1,795X_1X_2 + 2,390X_1X_3$	0,931	0,879
$HOSC = 5,58 - 0,063X_1 + 0,002X_1^2 + 56,198X_2 - 68,591X_2^2 + 9,745 - 0,278X_1X_2 + 0,164X_1X_3 - 35,020X_2X_3$	0,963	0,914

Os coeficientes de correlação, R^2 e R_{ajust}^2 , elevados ($>0,65$) para todas as respostas estudadas, sugerem uma estreita concordância entre os dados experimentais e os valores teóricos previstos pelo modelo. Para PT, a equação do modelo polinomial tem um R_{ajust}^2 de 0,995, indicando que os resultados determinados pelo método de Foli-Ciocalteu para este DOE são em tudo coerentes com os esperados pelo modelo.

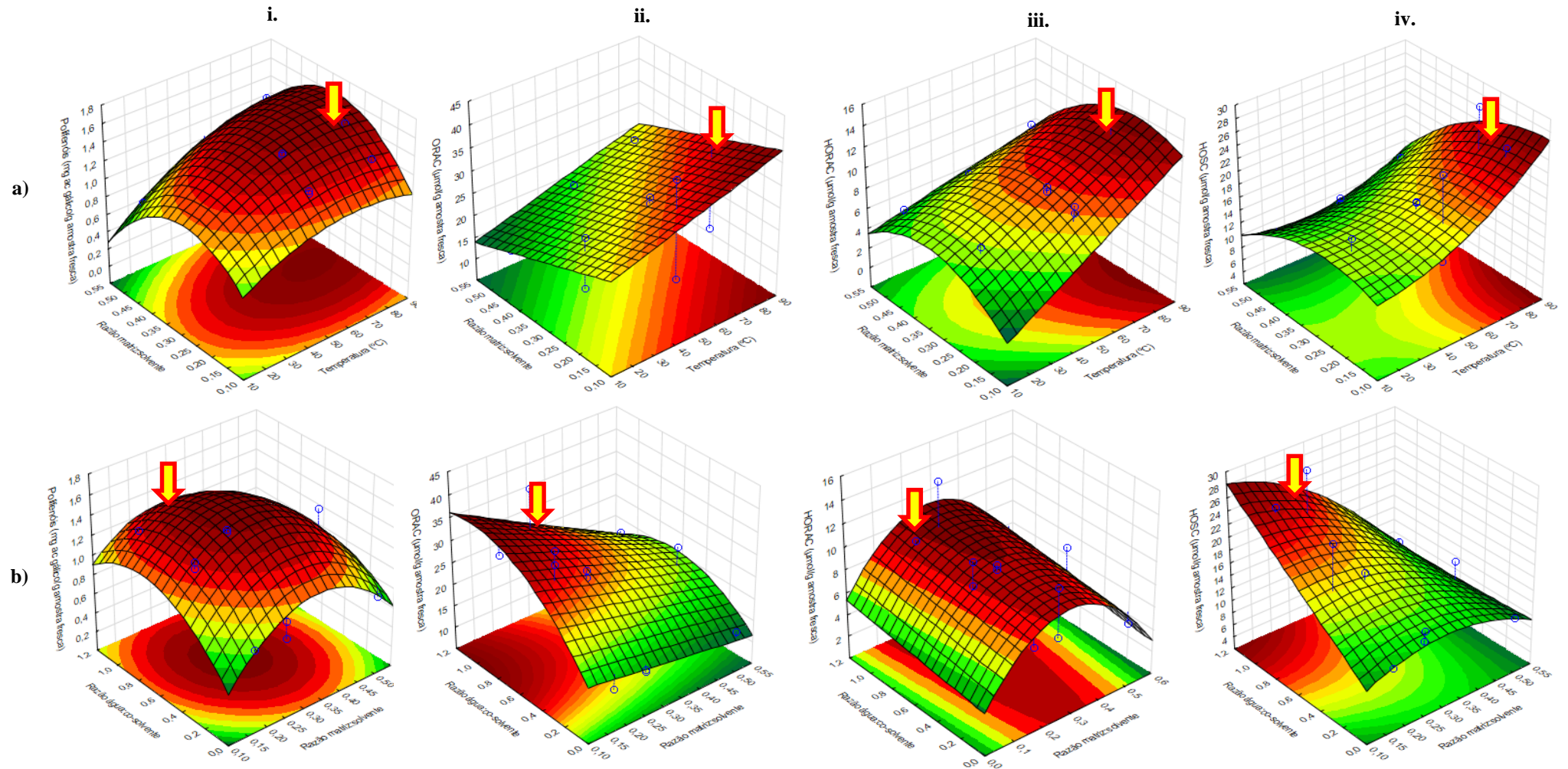


Figura 3.3. – Superfícies de Resposta (DOE PG:H₂O) ajustadas para o teor em Polifenóis Totais (i.) e a actividade antioxidante pelos métodos ORAC (ii.), HORAC (iii.) e HOSC (iv.), em função das 2 combinações a) e b) de respostas mais favoráveis (↓ indica a localização da melhor condição obtida experimentalmente para cada interacção, em cada superfície).

Na análise das superfícies de resposta fornecidas pelo *software* foi possível concluir sobre as condições mais promissoras (zonas a **vermelho escuro**) para elaboração de extractos com maximização de PT, ORAC, HORAC e HOSC. Estas podem ser consultadas na tabela 3.9.

Tabela 3.9. – Condições de temperatura (X_1), razão matriz:solvente (X_2) e razão água:co-solvente (X_3) mais favoráveis, definidas a partir da observação das superfícies de resposta ajustadas para o teor em PT, TT, ORAC, HORAC e HOSC (DOE PG:H₂O)

Respostas	Melhores condições das Superfícies de Resposta		
	Temperatura (X_1)	Razão Matriz:Solvente (X_2)	Razão H ₂ O:PG (X_3)
PT	80 °C - 90°C	1:3	1:1
ORAC	80 °C - 90°C	1:4 – 1:6	0:1
HORAC	80 °C - 90°C	1:5 ^{a)}	0:1
		1:4 ^{b)}	
HOSC	80 °C - 90°C	1:4 – 1:6	0:1

^{a)} Condição mais favorável retirada da interacção a)
^{b)} Condição mais favorável retirada da interacção b)

Globalmente observou-se que as respostas ORAC e HOSC tiveram o mesmo comportamento, no que respeita as condições mais favoráveis de ambas as interacções. As condições óptimas de extracção de PT cedidas pela análise estatística deste DOE, também foram Sabendo que experimentalmente o extracto PG 13 (T= 80 °C, razão matriz:solvente = 1:4 e razão água:PG = 0:1) foi aquele com resultados mais elevados para todas as respostas determinadas neste DOE, colheu-se que existe concordância entre os dados experimentais e os valores teóricos previstos. Tal como como afirmado para o DOE EtOH:H₂O, de modo a efectivar esta análise, futuramente será necessário a elaboração de novas extracções utilizando as condições óptimas fornecidas pelas superfícies de resposta e posteriormente determinar o rendimento em função das respectivas respostas.

- Comparação entres DOE EtOH:H₂O e DOE PG:H₂O

De um modo geral concluiu-se que os resultados mais elevados foram obtidos com o extracto PG 13 (T=80 °C, 20 mL de PG adicionado). Tal como já foi abordado, a literatura fornece dados de que para a extracção de PT, uma maior temperatura, dentro da gama estudada, é favorável. Acima dos 80 °C poderá ocorrer degradação destes fitoquímicos, mas somente a realização da experiência poderá comprovar este facto. Considerando agora a extracção com este solvente, o papel do sistema PG:H₂O na extracção de compostos bioactivos ainda não foi amplamente investigado. Em 2002, Ardisson et al. concluíram que a extracção de compostos fenólicos de *Stryphnodendron adstringens* foi mais eficiente com uma solução de 80% de PG. Para comparar os resultados obtidos com os apresentados na literatura seria necessário ter em conta que mesmo quando se adicionou 100% de co-solvente, a matriz em estudo não estava desidratada. Deste modo, considerou-se que aproximadamente 95% de água constituem o agrião, ou seja, que em 5 g de agrião extraído 4,75 g (4,75 mL, com $\rho_{\text{água}} = 1 \text{ g/mL}$) são água. Recordando as condições que permitiram valores de polifenóis e de actividade antioxidante mais elevados, sabe-se que o extracto foi obtido com 20

mL de PG. Somando os 4, 75 mL de água da matriz, conclui-se que a mistura extractora na realidade continha aproximadamente 81% de PG, resultado que vai ao encontro do reportado por Ardisson et al. Melhores respostas para nível intermédio de solvente adicionado (X_2) poderão estar relacionadas com o facto de que somente 10 mL de solvente não são suficientes para a extracção de todos os compostos presentes na matriz, promovendo a saturação do solvente, e que a adição de 30 mL de PG resultar num extracto menos concentrado, por dificuldade na evaporação do PG, que é processo bastante moroso e dispendioso, não justificado nesta fase dos trabalhos. Em trabalhos futuros, para se concluir com certeza se volumes maiores de PG resultariam ou não num extracto mais rico em compostos de interesse, seria necessário proceder-se à evaporação deste solvente e repetir as análises de PT, ORAC, HORAC e HOSC.

Analisando as diferenças compreendidas entre os dois DOE's, as respostas estudadas no DOE PG:H₂O são superiores às estudadas no DOE EtOH:H₂O. Sabe-se que o PG é um solvente mais polar que o EtOH, o que pode ser verificado através da sua constante dielétrica, $\delta=32$ (PG) e 25 (EtOH). Sabe-se ainda que o PG é um solvente lipofílico, contrariamente ao que acontece com EtOH, que é mais hidrofílico. Estas duas características, e a combinação com a hidrofiliabilidade da água podem justificar a extracção de um maior número de composto com o DOE PG:H₂O. Tubtimdee & Shotipruk, em 2011 estudaram a extracção de polifenóis de *Terminalia chebula* com PG:H₂O e EtOH:H₂O, concluindo que em ambos os sistemas, as condições de extracção óptimas deram-se para T= 70 °C e razão água:co-solvente de 40% de PG ou 63% EtOH. Este estudo reportou que os compostos fenólicos são extraídos em maior quantidade com o sistema EtOH-água, contrariamente ao determinado neste trabalho. A explicação pode residir no facto dos níveis máximos para a variável razão água:co-solvente não serem os mesmos para os dois solventes. i.e. o limite máximo de razão água:co-solvente para EtOH é solução de 80% etanol e para PG é solução de 47% de propilenoglicol. Se as extracções fossem realizadas adicionando a mesma quantidade de co-solvente, seria possível efectivar qual dos dois sistemas seria o melhor para a extracção de polifenóis.

No caso da quantificação dos terpenos e dos carotenóides, a conclusão de qual dos solventes seria o mais indicado para a obtenção de extractos ricos nestas famílias de compostos, teria de ser efectuada recorrendo a outros métodos, nomeadamente cromatográficos, uma vez que não foi possível a análise de todos os extractos por limitações ao nível de incompatibilidades entre os solventes de extracção e os solventes dos métodos espectrofotométricos.

Por fim, comparando os resultados de polifenóis determinados os melhores extractos dos DOE's com o determinado para o extracto PT (tabela 3.1.) conclui-se que a maioria das condições de extracção testadas no desenho de experiências permitiram a obtenção de extractos mais ricos em polifenóis. No que respeita à quantificação de terpenos e de carotenóides, nenhum dos 26 extractos planeados pelo DOE e posteriormente quantificados nesse sentido, possuiu composição com maior ou igual teor que o Ext TT e o Ext CT, respectivamente.

- Verificação e validação do RSM utilizado na análise do DOE EtOH:H₂O e do DOE PG:H₂O

Após a exploração dos dois desenhos de experiências foi possível ainda considerar que, em ambos os DOE's, as superfícies de resposta obtidas para os valores de Polifenóis Totais permitiram a determinação

das condições ótimas. Recordando a teoria do RSM, a representação da superfície de resposta é um gráfico tridimensional que mostra a relação teórica entre a resposta e as variáveis independentes. Quando nos gráficos resultantes, os contornos na superfície possuem forma cuircular ou elíptica, o centro desse sistema surge associada à resposta máxima/ mínima. Por vezes, a resposta surge representada por parábolas ou hiperboles, sendo que nesses casos o ponto estacionário denomina-se ponto de sela e não é possível a identificação de ponto máximo/ mínimo. No entanto, é importante considerar que os gráficos dão informações úteis sobre o modelo ajustado, podendo não representar o verdadeiro comportamento do sistema, uma vez que as superfícies representam contornos da resposta estimada (Baş & Boyacı 2007). Ponderando estes conceitos, os pontos ótimos para as respostas PT (DOE EtOH:H₂O) e PT (PG:H₂O) corresponderam à primeira derivada de cada uma das equações polinomiais respectivas, quando estas são igualadas a zero.

O *software* Statistica permitiu a determinação dos valores críticos para cada uma das variáveis, que correspondem às condições ótimas para obtenção de um valor de polifenóis máximo. Na tabela 3.10. encontram-se discriminadas as condições e a previsão do valor de PT máximo para cada um dos DOE's estudados.

Tabela 3.10.- Valores críticos (condições ótimas) determinados pelo *software* e previsão do valor de PT no extracto elaborado nessas condições

Factor	DOE EtOH:H ₂ O			DOE PG:H ₂ O		
	Mínimo observado	Valores Críticos	Máximo observado	Mínimo observado	Valores Críticos	Máximo observado
Temperatura °C (X₁)	20	86	80	20	82	80
Razão Matriz:Solvente (X₂)	1:6	1:2,8	1:2	1:6	1:3	1:2
Razão H₂O:Co-solvente (X₃)	0	0,66:0,44	1	0	0,28:0,72	1
Polifenóis Totais (mg EAG/ g m.f.)		1,27			1,67	

A fim de validar o modelo polinomial ajustado, foram elaboradas duas extracções com as condições ótimas descritas na tabela 3.10. Os valores de PT para estes extractos foram comparados com os previstos pelo modelo. De modo a se verificar se estas condições ótimas para PT, exerciam influência na actividade antioxidante, foram determinados também os valores de ORAC. Os resultados obtidos podem ser consultados na tabela 3.11.

Tabela 3.11.- Valores de PT ótimos para os DOE's EtOH:H₂O e PGH:H₂O, e respectivos valores de ORAC

Extracto	Polifenóis Totais (mg EAG/ g m.f.)	ORAC (µmol ET / g m.f.)
EtOH:H₂O óptimo	1,24	20,25
PG:H₂O óptimo	1,60	32,40

Observou-se que os resultados de polifenóis totais determinados para os extractos em condições ótimas, são superiores aos teores de PT nos extractos dos desenhos de experiências testados anteriormente. Comparando com os valores previstos pelo RSM foi possível saber o erro através do cálculo erro percentual para cada DOE do modelo (tabela 3.12.).

Tabela 3.12.- Erro associado à determinação de Polifenóis Totais – valor previsto pelo modelo vs. valor determinado experimentalmente

Extracto	Erro Percentual (%)
EtOH:H ₂ O óptimo	2,42
PG:H ₂ O óptimo	4,38

Os erros determinados são inferiores a 5%, confirmando a validação do modelo dentro do domínio experimental testado.

No que respeita à determinação do valor de ORAC, desses mesmos extractos, constatou-se que no caso do DOE EtOH:H₂O, esta determinação de actividade antioxidante foi máxima com as condições críticas fornecidas para a resposta PT. Em relação ao DOE PG:H₂O, o valor de ORAC foi ligeiramente inferior ao máximo obtido na quantificação das extracções do desenho (ORAC PG:H₂O 13 = 39.31 µmol ET / g m.f.). Considerando que nas determinações de ORAC o erro associado a cada amostra de PG:H₂O 13 e PG:H₂O óptimo é 8,57 e 7,92, respectivamente, a discordância verificada pode dever-se a este factor.

3.4. Caracterização Fitoquímica por Métodos Cromatográficos

3.4.1. Cromatografia Líquida

Para complementar a análise espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu, procedeu-se à análise dos extractos de agrião, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Díodos e Detector Electroquímico (*High-Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector – Electrochemical Detection* (HPLC-DAD-ED)). Este método cromatográfico permitiu a identificação de alguns compostos fenólicos. Foram analisados os extractos PT (cujo solvente é MeOH), H₂O 7, e os extractos de ambos os DOE nas condições 9, 10, 13, 14 e 15, que foram escolhidos após tratamento dos resultados das análises prévias (PT, ORAC, HORAC e HOSC). Os perfis cromatográficos, obtidos ao comprimento de onda de 280 nm (detecção de compostos fenólicos) podem ser visualizados na figura 3.4..

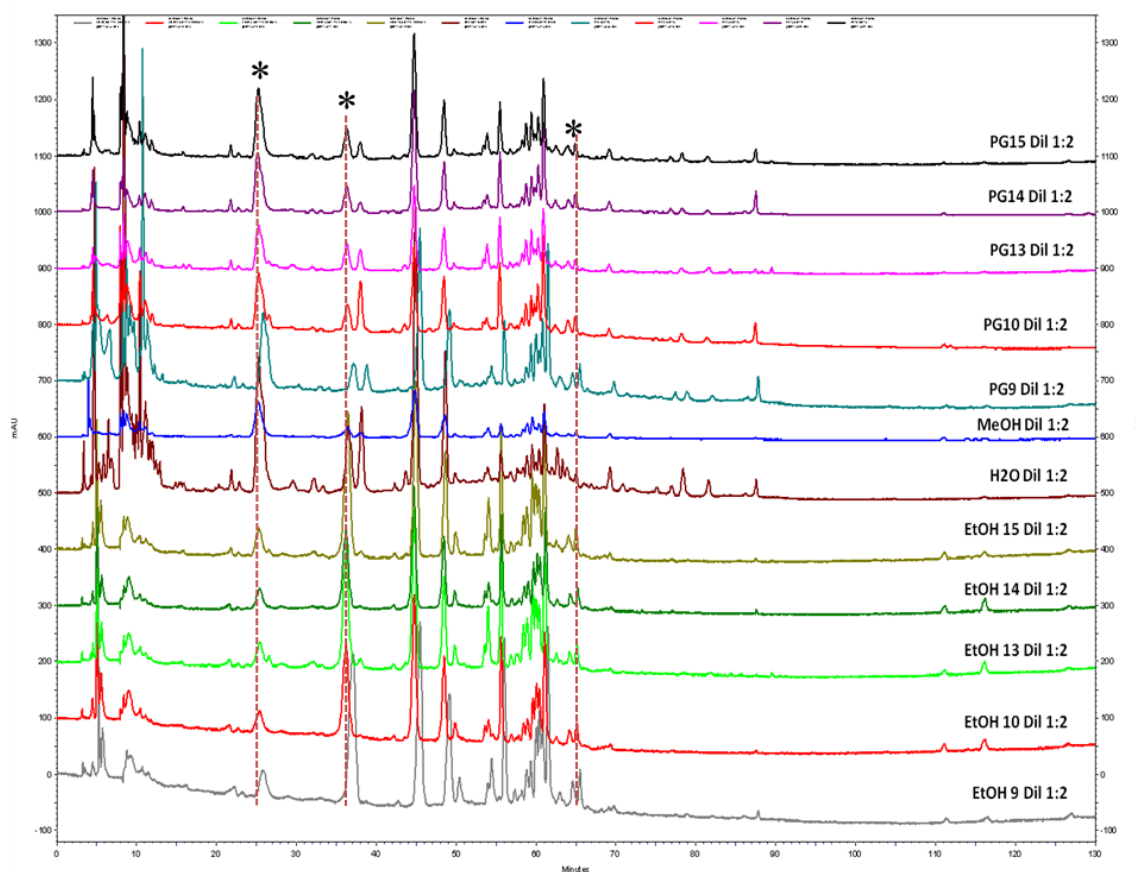


Figura 3.4. - Sobreposição dos perfis cromatográficos dos extractos de agrião (PG:H₂O 15, PG 14, PG 13, PG:H₂O 10, PG:H₂O 9, PT, H₂O 7, EtOH:H₂O 15, EtOH 14, EtOH 13, EtOH:H₂O 10, EtOH:H₂O 9) preparados com EtOH, H₂O, MeOH e Propilenoglicol (PG), a 280nm (* indica os compostos fenólicos que emitem actividade no detector electroquímico)

A análise dos perfis cromatográficos permitiu reafirmar que os extractos do DOE PG:H₂O são mais ricos em polifenóis totais que os do DOE EtOH:H₂O, nomeadamente em compostos cuja eluição ocorre depois do minuto 60. Esta conclusão já tinha sido retirada aquando da determinação espectrofotométrica de polifenóis totais, pelo método de Folin Ciocalteu. A observação do perfil cromatográfico de H₂O 7 mostrou que este extracto possui teor mais elevado de compostos fenólicos, contrariando o que foi determinado anteriormente. Tal facto poderá dever-se à presença de compostos interferentes na quantificação pelo método de Folin Ciocalteu, nomeadamente ácidos gordos, ácidos orgânicos, em concentrações mais elevadas nos extractos de PG e PG:H₂O.

Para concluir acerca da presença de ácidos fenólico e flavonóis, foram traçados os perfis cromatográficos a 320 e 360 nm (figura 3.5.).

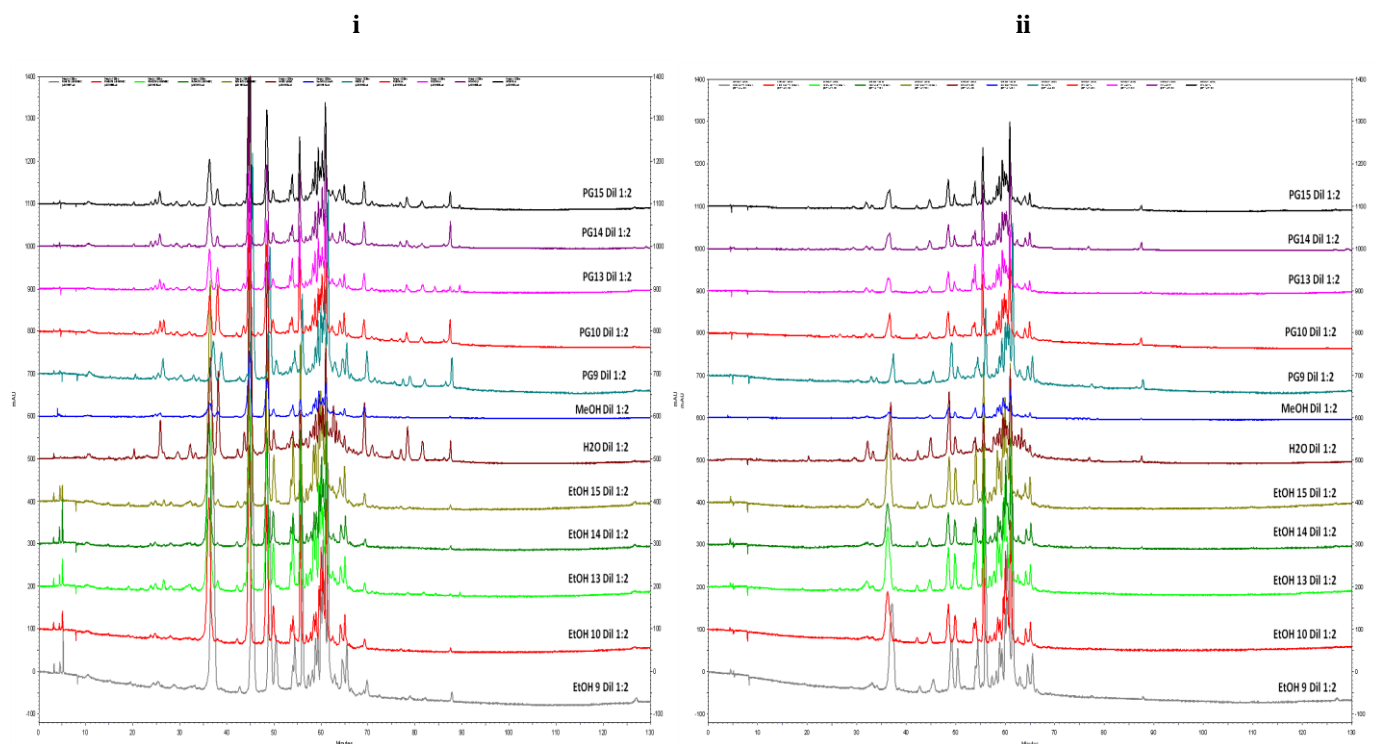


Figura 3.5. - Sobreposição dos perfis cromatográficos dos extractos de agrião (PG:H₂O 15, PG 14, PG 13, PG:H₂O 10, PG:H₂O 9, PT, H₂O 7, EtOH:H₂O 15, EtOH 14, EtOH 13, EtOH:H₂O 10, EtOH:H₂O 9) preparados com EtOH, H₂O, MeOH e Propilenoglicol (PG), a 320 nm (i) e 360 nm (ii)

Os perfis da figura 3.5. (i.) mostraram que os extractos de agrião são ricos em ácidos fenólicos. Na análise a este comprimento de onda, a observação dos cromatogramas conduz à conclusão que diferenças mais acentuadas verificaram-se principalmente com t_R aproximadamente 5 min, com picos mais visíveis para os extractos do DOE EtOH:H₂O e nos compostos a eluir em R entre 70 e 90 min, que se encontram mais concentrados nos extractos do DOE EtOH:H₂O e no extracto H₂O 7. Os perfis cromatográficos representados em 3.5. (ii.) permitiram concluir que as amostras são ricas em flavonóis, que apresentam absorção importante a 360 nm. No que respeita a este último grupo de compostos, os extractos analisados, com excepção do extracto de MeOH (PT), possuem perfis cromatográficos semelhantes. Os extractos do DOE de etanol possuem maior concentração do composto que elui a t_R ≈ 37 min. Por seu turno, em t_R próximo do minuto 90, os extractos de propilenoglicol e água exibem picos que não são visíveis nos extractos de etanol.

Considerando os quatro solventes utilizados, o extracto de MeOH (PT) aparentou uma das amostras com perfil fenólico mais pobre. Tal situação não era inicialmente esperada, uma vez que a metodologia de extracção foi escolhida para caracterizar a matriz no seu conteúdo em polifenóis, mas já tinha sido notada através do método de Folin Ciocalteu. A determinação da área total dos cromatogramas, em cada um dos três comprimentos de onda avaliados (tabela 3.13.) permitiu concluir acerca da concentração de compostos fenólicos em cada um dos extractos de agrião.

Tabela 3.13. – Quantificação de Polifenóis Totais, Ácido Fenólicos Totais e Flavonóides Totais, por integração das áreas dos picos dos cromatogramas a 280, 320 e 360 nm

Extracto	Área Total 280 nm	Polifenóis Totais (mg EAG/ g m.f.)	Área Total 320 nm	Ácido Fenólicos Totais (mg EAF/ g m.f.)	Área Total 360 nm	Flavonóis Totais (mg EQ/ g m.f.)
EtOH:H₂O 9	21246462	1,31	33883735	1,05	18850874	0,88
EtOH:H₂O 10	13996752	1,08	19488826	1,20	10268718	0,48
EtOH 13	17679396	1,37	25608930	1,98	15137391	0,89
EtOH 14	12941236	1,33	17592844	1,81	10829548	0,85
EtOH:H₂O 15	18959912	1,17	28457463	1,76	15957914	0,75
H₂O 7	67674466	3,49	54097715	2,79	24923128	0,97
MeOH (ExtPT)	32815086	1,45	33947322	0,87	16097920	0,31
PG: H₂O 9	29782752	2,45	32707918	2,69	17144927	1,07
PG: H₂O 10	41151454	1,70	45098137	1,86	24178860	0,76
PG13	26597948	2,74	32868880	3,39	16305052	1,28
PG14	64936522	2,68	76438062	3,15	38367525	1,20
PG: H₂O 15	40529788	2,50	44458186	2,75	24030164	1,13

Estas quantificações corroboraram as conclusões retiradas nos parágrafos anteriores. Os valores de PT determinados por integração das áreas e recorrendo a uma recta de calibração de ácido gálico ($y = 194165x + 3274.3$) foram comparados com os valores de PT determinados com o método de Folin Ciocalteu. De um modo geral, e apesar dos valores determinados por HPLC-DAD serem superiores, a comparação entre a composição fenólica dos extractos é bastante semelhante, com EtOH:H₂O 10 a ser o extracto com menor teor de PT, logo seguido por o Ext PT. Tal como referido através da análise dos cromatogramas, comprova-se que o extracto H₂O 7 possui um perfil fenólico bastante mais rico do que o previamente quantificado espectrofotometricamente. Confrontando os valores determinados com teores de PT apresentados na literatura, Martínez-Sánchez et al. 2008 reportaram um teor de 2,63 mg polifenóis totais / g m.f., valor que se assemelha aos teores de PT nos extractos de PG e de H₂O. Explorando os resultados obtidos para os ácidos fenólicos, particularmente os ácidos hidroxicinâmicos totais (com recta de calibração $y = 383469x + 255778$), visualizou-se que estes são maioritariamente mais elevados que os teores de polifenóis totais. Este facto pode ser justificado pela apetência dos compostos presentes nos extractos em absorverem a 320 nm. No que respeita as quantificações de flavonóis totais (determinados com $y = 256132x - 28762$), tal como já tinha sido referido, os perfis são bastante semelhantes para todos os extractos. Justesen & Knuthsen 2001 quantificaram o teor de dois flavonóis, quercetina e canferol em extractos de agrião, obtendo valores de 0,04 mg/ g m.f. e 0,01 mg/ g m.f., respectivamente. Em 2014, Santos et al. determinaram 1,369 mg de flavonóis/ g m.f. e 0,759 mg ácidos fenólicos/ g m.f. Comparando estes valores com os apresentados na tabela anterior, concluiu-se que os extractos analisados de propilenoglicol e de água possuem valores consideravelmente superiores de ácidos fenólicos. Relativamente aos flavonóis, os resultados alcançados são ligeiramente inferiores, sendo que também para estes compostos, os extractos do DOE PG:H₂O possuem um perfil mais rico, com o extracto PG 13 a ter concentração mais próxima da reportada (1,28 mg EQ/ g m.f.).

Para a identificação de compostos fenólicos recorreu-se à análise de 3 misturas distintas contendo padrões conhecidos e comparou-se os picos correspondentes com os picos do cromatograma do extracto PG 13. Essa comparação pode ser consultada na figura 3.6..

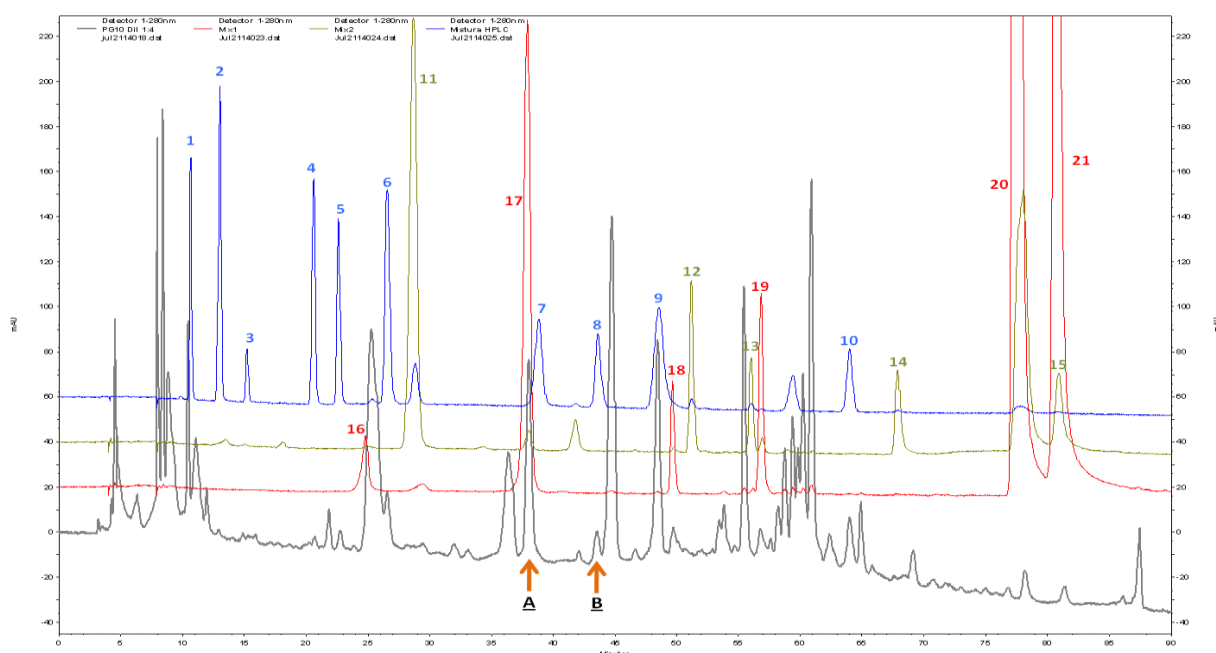


Figura 3.6. - Comparação dos perfis cromatográficos do extracto de PG, com os das misturas **HPLC** (1. Ácido gálico; 2. 5-HMF; 3. Ácido protocatechuico; 4. Ácido p-hidroxibenzóico; 5. Catequina; 6. Ácido cafeico; 7. Siringaldeído; 8. Ácido ferúlico; 9. Ácido salicílico; 10. Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico), **mistura 2** (11. Ácido siringico; 12. Luteolina-7-glucósido; 13. Canferol-3-glucósido; 14. Canferol; 15. Quercetina) e **mistura 1** (16. Ácido clorogénico; 17. Ácido p-cumárico; 18. Rutina; 19. Apigenina-7-glucósido; 20. Apigenina; 21. Isoramentina) a 280nm

Comparando com os padrões das misturas 1, 2 e de HPLC (identificação na legenda da figura 3.6) e com base nos tempos de retenção e espectro UV-Vis, nos extractos de agrião, foi possível uma provável identificação de em **A**- Ácido p-cumárico e em **B**- Ácido ferúlico. A presença de derivados de ácido p-cumárico e de ácido ferúlico foi anteriormente afirmada por Santos et al. 2014. Os mesmos autores, nesse estudo identificaram derivados de ácido gálico, ácido cafeico, ácido cumárico, entre outros. Voltando a considerar o cromatograma da figura 3.6., aquando das identificações aconteceu que muitos dos compostos testados, nomeadamente o 1 (ácido gálico), 6 (ácido cafeico), 9 (ácido salicílico), 15 (quercetina), 18 (rutina) ou 21 (isoramentina), possuem semelhanças com compostos presentes na matriz, mas a sobreposição dos picos não coincidiu. Noutro estudo, Boligon et al. 2013, identificaram a existência de ácido clorogénico, ácido cafeico e rutina. As divergências observadas, e os resultados distintos dos reportados por outros autores poderão ser justificados pelas desigualdades metodológicas no decorrer das várias fases de processamento (pré-tratamentos, condições/ tipos de extracção, etc.), mas também poderão dever-se a diferentes condições de cultivo das plantas utilizadas em cada estudo.

A análise electroquímica dos extractos (figura 3.7.) permitiu concluir se na composição dos mesmos, estavam presentes compostos com actividade electroquímica. A presença de compostos com sinal electroquímico indicou que possivelmente esses compostos possuem actividade antioxidante, contribuindo para os valores de ORAC, HORAC e HOSC, anteriormente calculados.

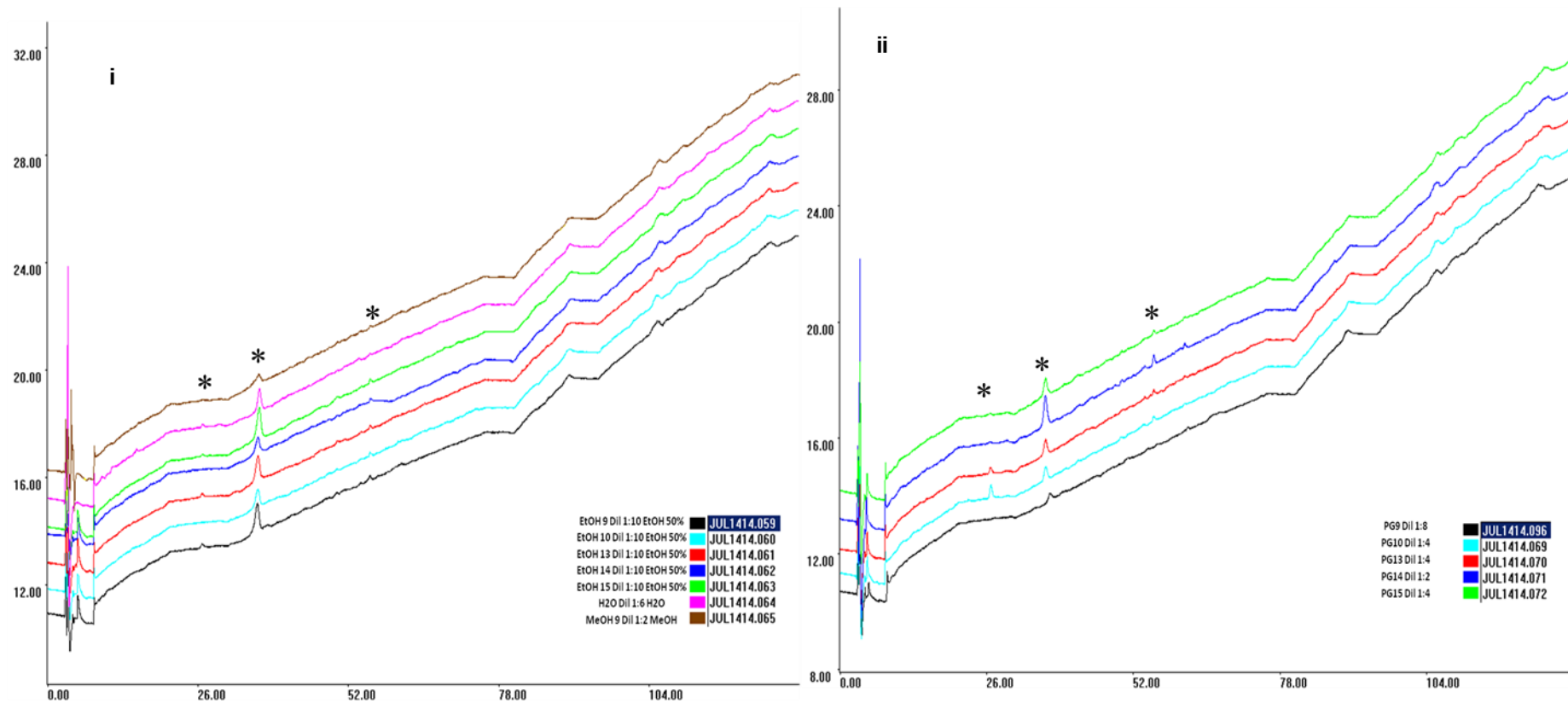


Figura 3.7. Comparação dos perfis cromatográficos dos extractos de agrião, obtidos no Electroquímico (ED) [i. extractos de EtOH, MeOH (Ext PT) e H₂O (H₂O 7) ii. extractos de PT (* representam os compostos que emitem sinal e que foram quantificados)

A apreciação conjunta das figuras 3.7.i. e 3.7.ii. possibilitou mais uma vez à verificação de que os extractos do DOE PG:H₂O são mais ricos em compostos com actividade antioxidante, pela maior prevalência de picos em ii. Os compostos com tempos de retenção próximos de 44 minutos, 62 minutos e 120 minutos somente podem ser visualizados nas análises electroquímicas dos extractos do DOE PG:H₂O. No entanto, observando o comportamento dos cromatogramas no minuto 37, o pico revelou-se mais intenso nos extractos do DOE EtOH:H₂O (3.7.i.), tal como previamente já tinha sido constatado nos cromatogramas de HPLC-DAD que estes extractos tinham teor mais elevado deste composto.

Comparando os resultados da análise Electroquímica dos extractos, com os cromatogramas dos mesmos a 280 nm (figura 3.4.) conseguiu-se facilmente identificar nos cromatogramas de díodos quais os compostos com actividade electroquímica. Com os dados da área relativa de cada desses picos (representados na figura 3.4 por *) e recorrendo a uma curva de calibração de Trolox ($y = 5,7501x + 4,8094$) testada no detector electroquímico, foi possível calcular a actividade dos compostos que eventualmente poderão ser responsáveis pela actividade antioxidante dos extractos (tabela 3.14.)

Tabela 3.14. - Quantificação da Actividade Antioxidante ($\mu\text{mol ET/g m.f.}$), por integração das áreas de cada um dos picos assinalados com * na figura 3.7. e através da soma das áreas dos três picos.

Extracto	tR = 26,5 min		tR = 36,2 min		tR = 55,5 min		Soma tR	
	Área ED	$\mu\text{mol ET/g m.f.}$	Área ED	Área ED	Área ED	$\mu\text{mol ET/g m.f.}$	Soma Áreas ED	$\mu\text{mol ET/g m.f.}$
EtOH:H₂O 9	3,741	< L.Q.	53,965	2,890	2,890	< L.Q.	149,42	1,206
EtOH:H₂O 10	< L.D.	< L.Q.	31,411	3,369	3,369	< L.Q.	83,19	0,654
EtOH 13	3,094	< L.Q.	47,523	2,657	2,657	< L.Q.	128,01	1,027
EtOH 14	< L.D.	< L.Q.	32,466	2,906	2,906	< L.Q.	84,93	0,668
EtOH:H₂O 15	1,167	< L.Q.	57,113	4,039	4,039	< L.Q.	154,44	1,248
H₂O 7	2,931	< L.Q.	33,163	1,152	1,152	< L.Q.	81,17	0,637
PG: H₂O 9	< L.D.	< L.Q.	9,879	1,333	1,333	< L.Q.	13,81	0,150
PG: H₂O 10	14,141	0,052	16,294	2,942	2,942	< L.Q.	50,00	0,251
PG13	5,148	0,004	21,877	2,775	2,775	< L.Q.	43,41	0,429
PG14	0,928	< L.Q.	43,632	7,716	7,716	0,008	72,15	0,187
PG: H₂O 15	0,930	< L.Q.	20,315	2,750	2,750	< L.Q.	32,46	0,092

< L.D. – abaixo do limite de detecção

< L.Q. – abaixo do limite de quantificação

Analisando os dados da tabela, importou apontar que apesar de unicamente se conseguiram quantificar os picos de PG em tR = 26,5 (PG 10 e PG 13) e em tR = 55,5 (PG 14), os extractos de DOE EtOH:H₂O revelaram maior actividade no detector electroquímico, contrariamente ao calculado com ORAC. Estas diferenças poderão estar relacionadas com a área dos picos nos primeiros 8 min que não foram consideradas, por corresponderem a compostos que não possuam afinidade com a coluna utilizada na análise, mas que tem actividade (ácidos orgânicos, proteínas, etc.).

De modo a facilitar a visualização da relação entre as determinações, os dados para actividade antioxidante pelo mecanismo de ORAC foram traçados contra a área do pico de cada composto analisado e contra a soma das áreas dos três picos da detecção electroquímica, para avaliar a correlação entre as duas metodologias, por elaboração de graficos de dispersão.

Somente duas das regressões lineares testadas forneceu R^2 igual ou superior a 0,5: a correlação soma das áreas dos 3 picos vs ORAC ($R^2 = 0,52$) e a correlação de área tR = 36,2 min vs ORAC ($R^2 = 0,5$). Esta ultima correlação permite afirmar que este composto possui influência na actividade dos extractos. As determinações anteriores não permitiram afirmar que o ED fornece uma boa estimativa da actividade antioxidante dos extracto de agrião. Este facto pode ser justificado pelas distintas metodologias de medição da actividade antioxidante com mecanismos muito especificos. Assim sendo, actividade detectada no ED poderá correlacionar com outros mecanismos de actividade antioxidante.

A análise dos extractos por HPLC-DAD-ED apenas possibilitou a comparação dos perfis cromatográficos a diferentes comprimentos de onda e permitiu concluir sobre a familia dos compostos presentes nos extractos. Esta análise possibilitou ainda uma provável identificação do ácido cumárico e do ácido ferulico. A análise por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa foi utilizada para proceder à caracterização do extracto e os espectros de massa resultantes desta análise revelaram-se bastante úteis na identificação dos compostos que compõe os extractos de agrião.

Relembrando os resultados de caracterização dos extractos apresentados anteriormente (PT, actividade antioxidante e cromatogramas de HPLC), foi escolhida a condição 13 dos DOE's, como sendo aquela que permitiu obtenção de extracto com maior teor de polifenóis. Considerando este facto, e devido a possíveis complicações na injeção de PG no equipamento de LC-MS/MS (a viscosidade do PG poderia resultar na obstrução ou na contaminação da coluna cromatográfica), foi escolhido o extracto EtOH 13 para identificação de componentes químicos por espectrometria de massa. Os espectros de massa foram obtidos em modo "Full Scan" (m/z 60-1500), SIR e Daughter Scan para valores de m/z de maior interesse para o estudo. Aplicaram-se diferentes energias de colisão (20 e 30eV) para promover a fragmentação do ião molecular e determinar os fragmentos característicos do composto.

Foram traçados os cromatogramas a do extracto EtOH 13 a 280, 320 e 360 nm, comprimentos de onda que permitiram a análise de compostos fenólicos, ácidos fenólicos e flavonóis (figura 3.8.). A comparação do cromatograma a 280 nm com o da detecção no modo de varrimento (MS Scan) no espectrómetro de massa para o extracto analisado (EtOH 13) pode ser observado na figura 3.9.

A complexidade da matriz em estudo levou que fosse necessário proceder à hidrólise ácida do extracto, segundo a metodologia descrita por Mulinacci et al. 2006, de modo a simplificar a identificação dos compostos. Este passo permitiu a quebra dos compostos e a identificação da família a que pertenciam. Na figura 3.10, podem ser visualizados os cromatogramas do extracto hidrolisado, a 280 nm, a 320 nm e a 360 nm.

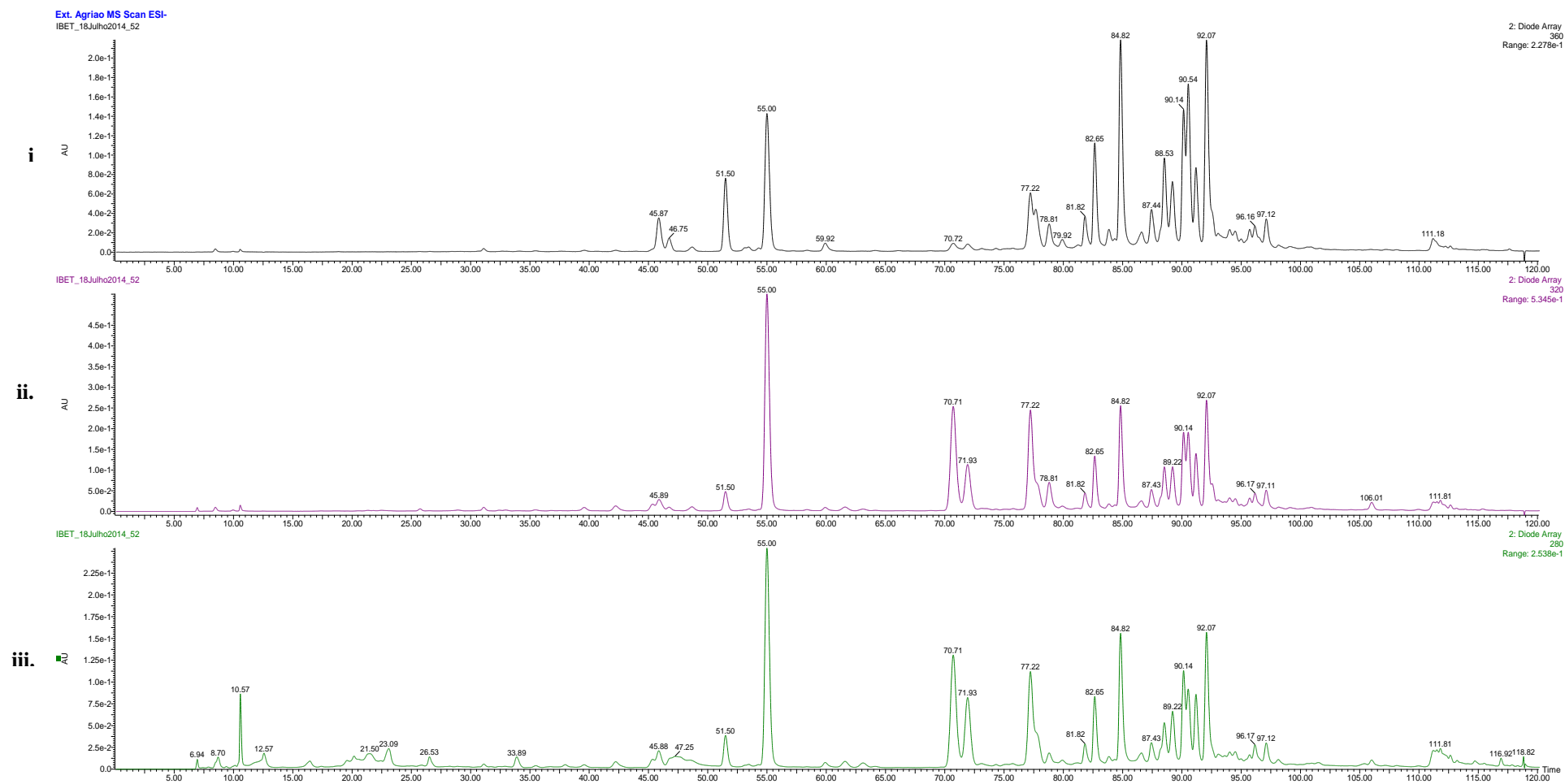


Figura 3.8. – Cromatogramas LC-MS do extracto EtOH 13, a 280 (i.), 320 (ii.) e 380 (iii.) nm

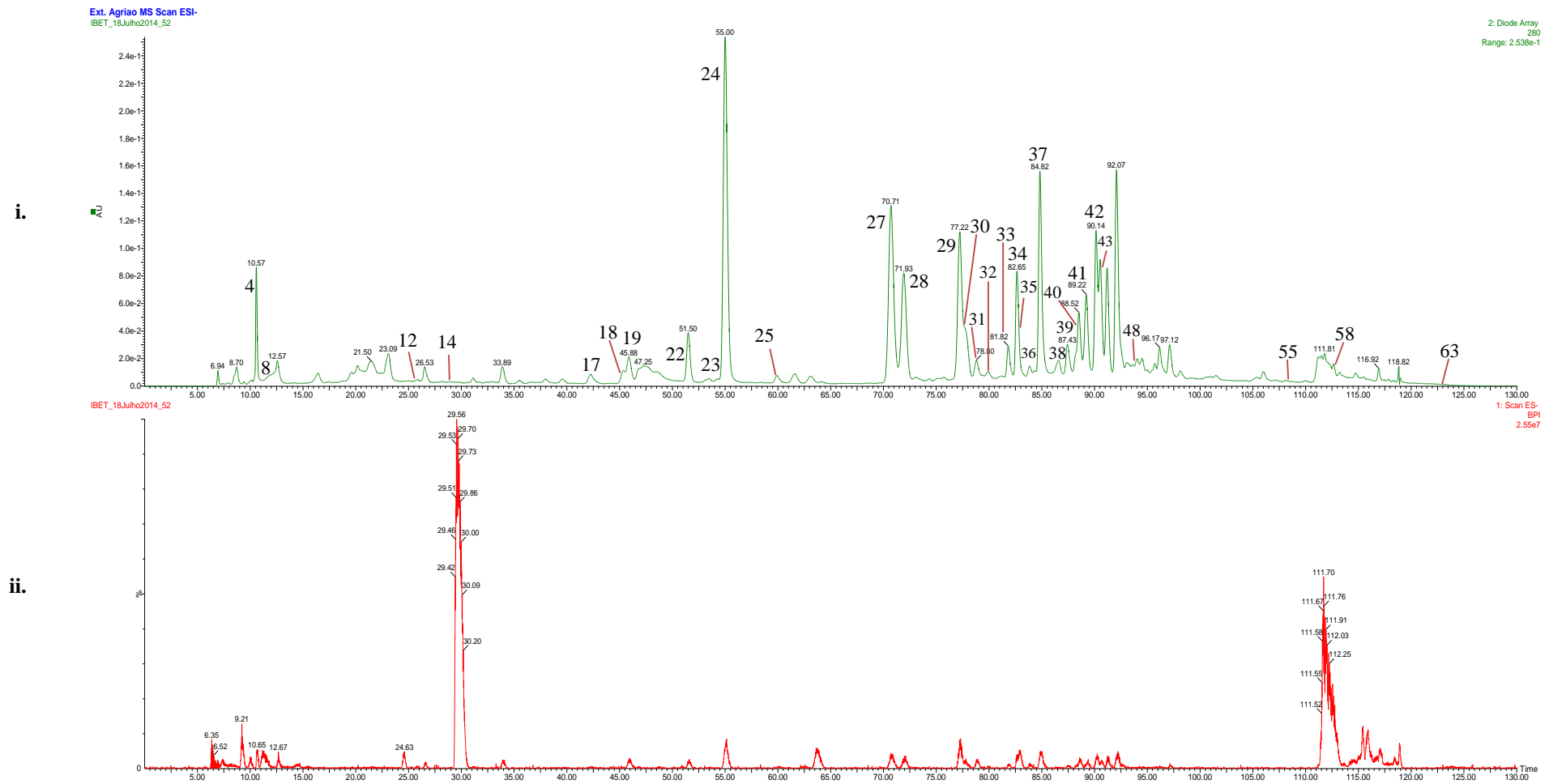


Figura 3.9. – Cromatograma a 280 nm (i.) e MS Scan (ii.) de EtOH 13

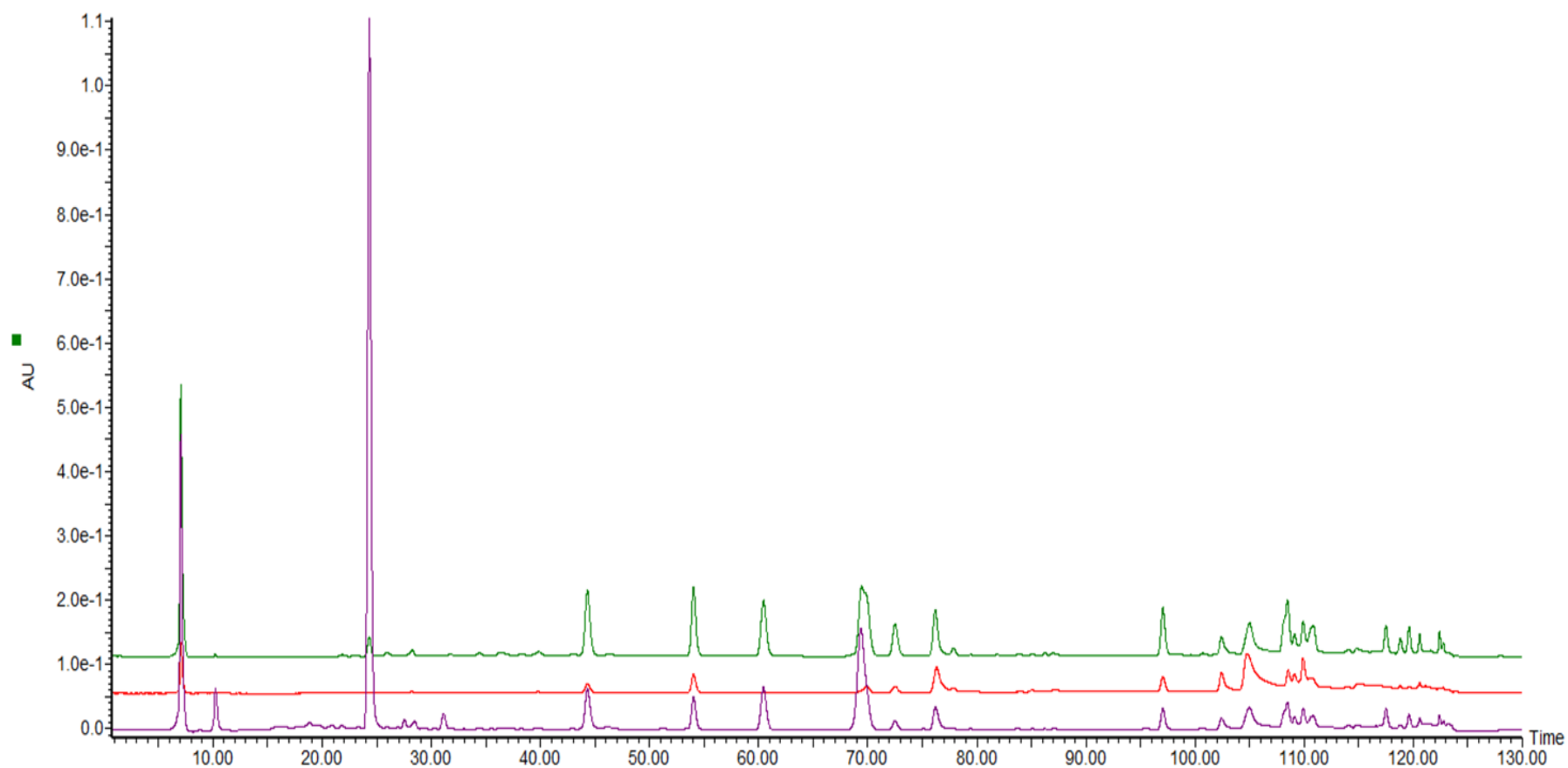


Figura 3.10. – Cromatogramas do extracto EtOH 13 após hidrólise ácida a 280, 320 e 360 nm

Através da análise dos cromatogramas da figura 3.10. observou-se que o pico maioritário na hidrólise tem um max a 280 nm ($t_R \approx 24$ min). Muito provavelmente este pico pertencem a um ácido benzóico, sendo necessário a optimização do método de detecção para confirmar a identificação. Os picos com maior absorção a 320 nm são provavelmente ácidos hidroxicinâmicos. Por fim a observação dos picos a 360 nm evidenciam a presença de flavonóis, nomeadamente as agliconas que foram libertadas pela acção da hidrólise. O pico com t_R 105 min possui um m/z de 301 que corresponde à quercetina. Em muitos dos picos detectados com espectrometria de massa surgiram valores de m/z característicos de ácidos fenólicos, como o m/z 163 característico do ácido coumárico, o m/z 193 representativo do ácido ferúlico e o m/z 179 do ácido cafeico.

A análise dos espectro de massa possibilitou a identificação de diversos compostos presentes na matriz agrião, que podem ser consultados na tabela 3.15.

Tabela 3.15.- Identificação de compostos de EtOH 13, por espectrometria de massa

Nº pico	tR (min)	[M-H] ⁻	Iões	ID Composto *
1	7,4	225, <u>195</u> , 132, 113	-	n.i.
2	9,4	305, <u>133</u> , 115	-	n.i.
3	10,2	405, 367, 329, 183, <u>145</u> , 101	-	n.i.
4	10,6	191	111,87,85,69	Ácido Cítrico
5	11,0	295, 279, <u>128</u>	-	n.i.
6	11,2	323	211,111,97,79	n.i.
7	11,8	147	129,103,101,85,57	n.i.
8	12,6	295, 243, <u>191</u> , 128, 111	[191] 111,87,85	Ácido Quínico
9	16,1	362	211,150,97,79	n.i.
10	19,7	565, 282	282,150,133,108	n.i.
11	24,6	478	463, 414, 195,169,97	n.i.
12	25,8	315	152,108	Ácido Protocatechuico Hexosido
13	26,7	447, 584, 515	[447] 97,96,75	
14	28,9	315	153,109	Ácido Protocatechuico Hexosido
15	30,4	492, <u>422</u>	-	n.i.
16	34,1	477	97	n.i.
17	42,3	325	145,119,89	p-Coumaroil Hexosido
18	45,2	179	135,107	Ácido Cafeico
19	45,9	625	625,462,301,299	Quercetina-3-soforosido
20	46,8	771	609,462	n.i.
21	48,7	385	205,190	n.i.
22	50,8	711	667,505,462,301	Derivado Quercetina
23	53,4	609	609,447,285	Derivado do Canferol
24	55,1	591	295,179,133,115,71	Ácido Cafeoil Málico
25	59,9	695	651,489,285	Derivado de Canferol
		385	267,249,134,113,91	n.i.

Tabela 3.15.- Identificação de compostos de EtOH 13, por espectrometria de massa (continuação)

Nº pico	tR (min)	[M-H] ⁻	Iões	ID Composto *
26	63,6	462, 322	-	n.i.
27	70,7	581	559,257,185,163,133, 115,71	Ácido p-Coumaroil Málico
28	72,0	581	279,163,115,71	Ácido p-Coumaroil Málico
29	77,3	641	309,193,179,133,91	Derivado do Ácido Ferúlico
30	77,8	309	223,193,179,133,91	n.i.
	78,2	609	301	Rutina
31	78,9	339	223,179,164,149,133, 115,71	Ácido Sinapoil Málico
32	79,9	463	300,271,255,196	Quercetina-3-O-glucosido
33	81,8	933	933,625,609,301	Derivado de Quercetina
34	82,6	787	787,625,463,301	Derivado de Quercetina
35	82,8	477	477,97	n.i.
36	83,8	505	301,300,271,255	Quercetina-3-acetilglucosido
37	85,0	873	829,786,625,505,301, 153	Derivado Quercetina
38	86,7	787	625,463	n.i.
		873	505,829,625,301	Derivado Quercetina
		917	917,609,593,285	Derivado Canferol
39	87,6	977	977,669,609,498,415, 301	Derivado Quercetina
		771	609,447,285,169	Canferol 3-O-β-d-glucosil β-d-galactosido 7-O-β-d glucosido
40	88,5	831	831,669,463,315,301	Derivado Quercetina
		917	917,873,642,609	Derivado de Canferol
41	89,4	771	771,609,463,301	Quercetina 3-O-galactosil-rutinósido
		947	947	n.i.
42	90,2	801	801,639,463,315,301	6-Hydroxil Canferol
		857	813,609,489,367,285	Derivado Caferol
43	90,6	917	873,669,519,505,301	Quercetina-3-O-glucosil-rahmnsoil (p-coumaroil)-Hexosido
		873	873,829,625,505,367, 301,299	Quercetina-3-O-caffeoil-glucosil-6manolil-glucosido
		801	639	n.i.
44	92,5	939, 917, 887, 843 753	-	n.i.
45	92,6	901, 887, 873, 753	-	n.i.
46	93,5	931, 873, 813, 755	-	n.i.

Tabela 3.15.- Identificação de compostos de EtOH 13, por espectrometria de massa (continuação)

Nº pico	tR (min)	[M-H] ⁻	Iões	ID Composto *
47	94,0	917, 887, 843, 831, 723, 521	-	n.i.
48	94,3	771	609,463,301	Quercetina-3-O-glucosil- rutinosido
49	95,1	947, 917, 843, 813, 785	-	n.i.
50	95,6	901, 857, 801	-	n.i.
51	96,2	917,857,841, 797		n.i.
52	96,7	931, 917, 887, 873, 857, 841, 813, 797	-	n.i.
53	97,2	887, 871, 843, 827		n.i.
54	105,1	339	-	n.i.
55	108,6	643	341,301	Derivado Quercetina
56	111,7	629	585,462	n.i.
57	112,0	353	353,97	n.i.
		339	339,179,133,135,115	n.i.
58	112,6	729	38/301	Derivado Quercetina
		685	460/301	Derivado Quercetina
59	114,4	715	627,671504	n.i.
60	116,5	315	315,297,171,12,/97	n.i.
61	116,8	715	671,627,504	n.i.
		327	229,291,211	n.i.
62	117,1	315	315,297,171,155,141, 127	n.i.
63	123,3	713	625,285	Derivado Canferol
		669	625,285	Derivado Canferol
		625	625,424	n.i.

* a fragmentação obtida para os valores de m/z foi comparada com a fragmentação apresentada na base de dados MassBank 2006

n.i. – não identificado

A partir da visualização da tabela anterior concluiu-se que a matriz agrião é muito rica em flavonóis, tal como já tinha sido referido anteriormente, nomeadamente a rutina, derivados de quercetina e derivados de canferol. O principal composto do extracto EtOH 13, correspondente ao pico de maior intensidade (tR = 55,1 min) correspondeu ao ácido cafeoil málico. Foi ainda possível a identificação de alguns ácidos fenólicos, tais como ácido cafeico, derivado do ácido ferúlico; e alguns ácidos orgânicos, como foi o caso do ácido cítrico, do ácido quínico e de derivados do ácido málico.

Como se pode verificar na tabela, alguns dos fitoquímicos não puderam ser identificados. Deste modo, a caracterização da composição da matriz agrião por LC-MS é um trabalho que vai ser continuado. Para tal vão ser analisados mais extractos, realizados em condições distintas, tal como o extracto H₂O 7 que revelou um perfil fenólico mais rico na análise HPLC-DAD. Num futuro próximo vão ser concluídas todas as análises necessárias de modo a se obter uma caracterização total da matriz agrião.

3.4.2. Cromatografia Gasosa

O estudo da composição química dos extractos de agrião foi complementada com a análise cromatográfica por GC-MS, que permitiu identificar e quantificar, em percentagem da área do pico, os compostos voláteis presentes no agrião e nos extractos eleitos. Todas as corridas cromatográficas foram realizadas sem um padrão interno, isto é, não foi adicionado às amostras uma substância química, que sendo semelhante aos compostos encontrados nas amostras, não se encontra nas mesmas. O acréscimo deste padrão, em concentrações conhecidas, possibilitaria uma quantificação mais fidedigna dos voláteis presentes no agrião, bem como a correcção de erros instrumentais, nomeadamente a possibilidade de perda de amostra na injeção manual. A escolha do padrão interno deve ser feita tendo em atenção a composição exacta das amostras, para certificar que este não está presente. Quando os cromatogramas resultantes são complexos, pode optar-se por usar um isótopo marcado (ex. ^{13}C); o custo destes é elevado, não justificando a sua utilização nesta fase do trabalho. Os compostos presentes foram identificados por comparação com espectros de massa de cinco bibliotecas (NIST21, NIST27, NIST107, NIST147 e WILEY229), para índices de semelhança (IS) $\geq 85\%$, e foram determinados os seus índices de retenção (iR). Posteriormente, a sua quantificação foi realizada por determinação da percentagem relativa de cada uma das áreas. Para confirmação dos tempos de retenção em função dos índices de retenção conhecidos, foram analisadas duas misturas de alcanos C8 – C20 em hexano e C10 – C40 em heptano (tabela 3.16. e figura 3.11.). Os índices de retenção determinados para cada um dos compostos voláteis identificados, foram calculados por interpolação linear dos tempos de retenção relativos aos padrões (C7-C24) nas mesmas condições de análise GC-MS (coluna factor Four) (Anexo IV) e a validação da identificação foi feita por comparação dos iR's calculados com os fornecidos pela literatura (Acree & Arn n.d., Ansorena et al. 2001, El-Sayed 2003, Adams 2007, NIST 2011 e RSC 2014). Foi determinado o erro percentual utilizando o iR calculado e iR fornecido pela literatura e a identificação dos compostos foi aceite para erros menores que 3%.

Tabela 3.16. – Identificação dos Índices de Retenção e dos Tempos de Retenção da mistura de alcanos (padrão)

Nº pico	Composto	iR	tR (min)
1	Heptano	700	2,89
2	Octano	800	5,44
3	Nonano	900	9,32
4	Decano	1000	13,03
5	Undecano	1100	16,41
6	Dodecano	1200	19,64
7	Tridecano	1300	22,45
8	Tetradecano	1400	25,09
9	Pentadecano	1500	27,60
10	Hexadecano	1600	29,96
11	Heptadeca	1700	32,19
12	Octadecano	1800	34,33
13	Nonadecano	1900	36,36
14	Eicosano	2000	38,30
15	Docosano	2200	41,92
16	Tetracosano	2400	45,42

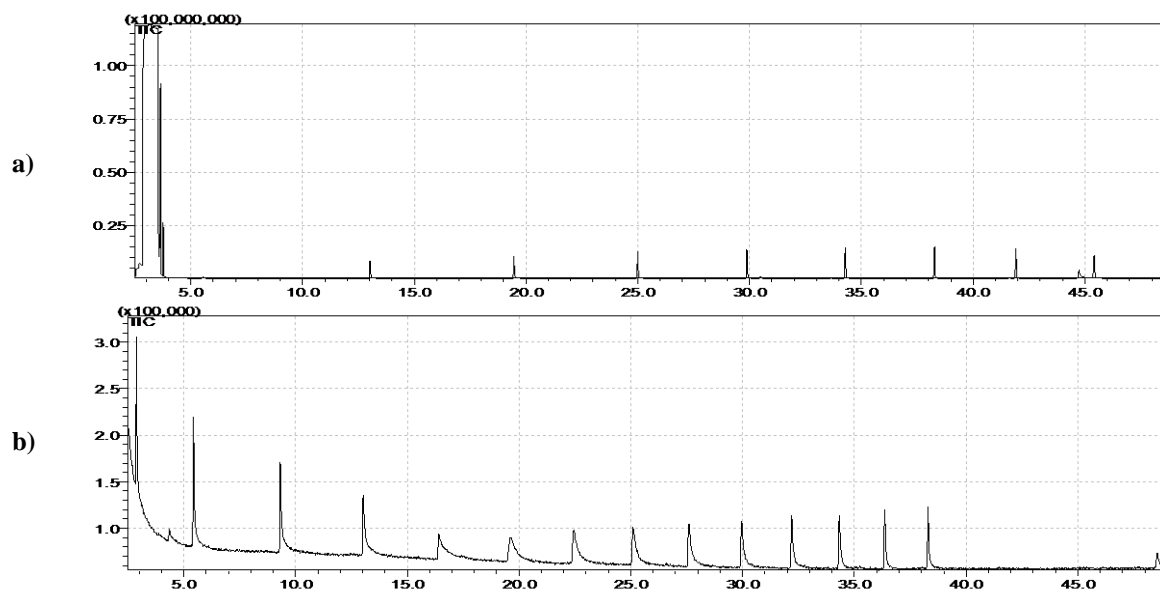


Figura 3.11 – Cromatograma GC-MS da análise realizada com as misturas de alcanos padrão a) mistura de alcanos C8 – C20 b) mistura de alcanos C10 – C40

Inicialmente, de modo a caracterizar a matriz, foi realizada uma análise ao agrião utilizando uma fibra de sílica. Esta esteve 30 min em contacto com a amostra para extracção dos compostos voláteis no *headspace* do vial, sendo depois auto-injectada. O cromatograma resultante (figura 3.12.) permitiu a detecção de 55 compostos presentes no agrião. Foi possível observar dois picos saturados, nos tempos de retenção (tR) 14 min, correspondente ao limoneno e 27,22 min, referente ao 2-feniletil isotiocianato. Os picos saturados representaram um problema, por alterarem a realidade no que respeita ao cálculo das percentagens das áreas dos picos para a quantificação dos compostos. Na tabela 3.17., encontram-se resumidos os compostos identificados, ordenados por tR. Analisando a tabela constatou-se que uma parte significativa dos compostos são hidrocarbonetos, aldeídos, e isotiocianatos, sendo espectável a presença destas classes de fitoquímicos. Diversos estudos reportam a existência de isotiocianatos no agrião, sendo que tal como é visível pela % relativa da área do pico, o 2-feniletil isotiocianato, mais conhecido por PEITC, é o principal isotiocianato desta matriz (Macleod & Isla, 1975 e Palaniswamy et al. 2003). No que respeita aos terpenos e compostos odorantes existentes, em 2012 Amiri analisou os compostos voláteis do óleo essencial das folhas de agrião, dos caules de agrião e das flores de agrião. Segundo o seu trabalho, foram mencionados 9 compostos voláteis constituintes das folhas e 8 compostos constituintes dos caules e 15 compostos constituintes das flores. A miristicina, limoneno e terpinoleno; óxido de cariofileno e p-cimeno-8-ol; limoneno e terpinoleno foram, pela ordem indicada, assinalados como os principais voláteis em cada um dos óleos. Nesta análise foram utilizadas folhas e caules do agrião, sendo possível identificar, como já foi referido, limoneno com uma % relativa da área do pico bastante elevada, o óxido de cariofileno com uma percentagem relativa da área do pico significativa, seguindo-se o β -mirceno, o terpinoleno, o terpineno e o óxido de limoneno; em concentrações mais reduzidas foram identificados o α e β -pineno, o estireno, o sabineno e o p-cimeno. Em relação à presença dos hidrocarbonetos, foi reportada por Spense et al. 1983

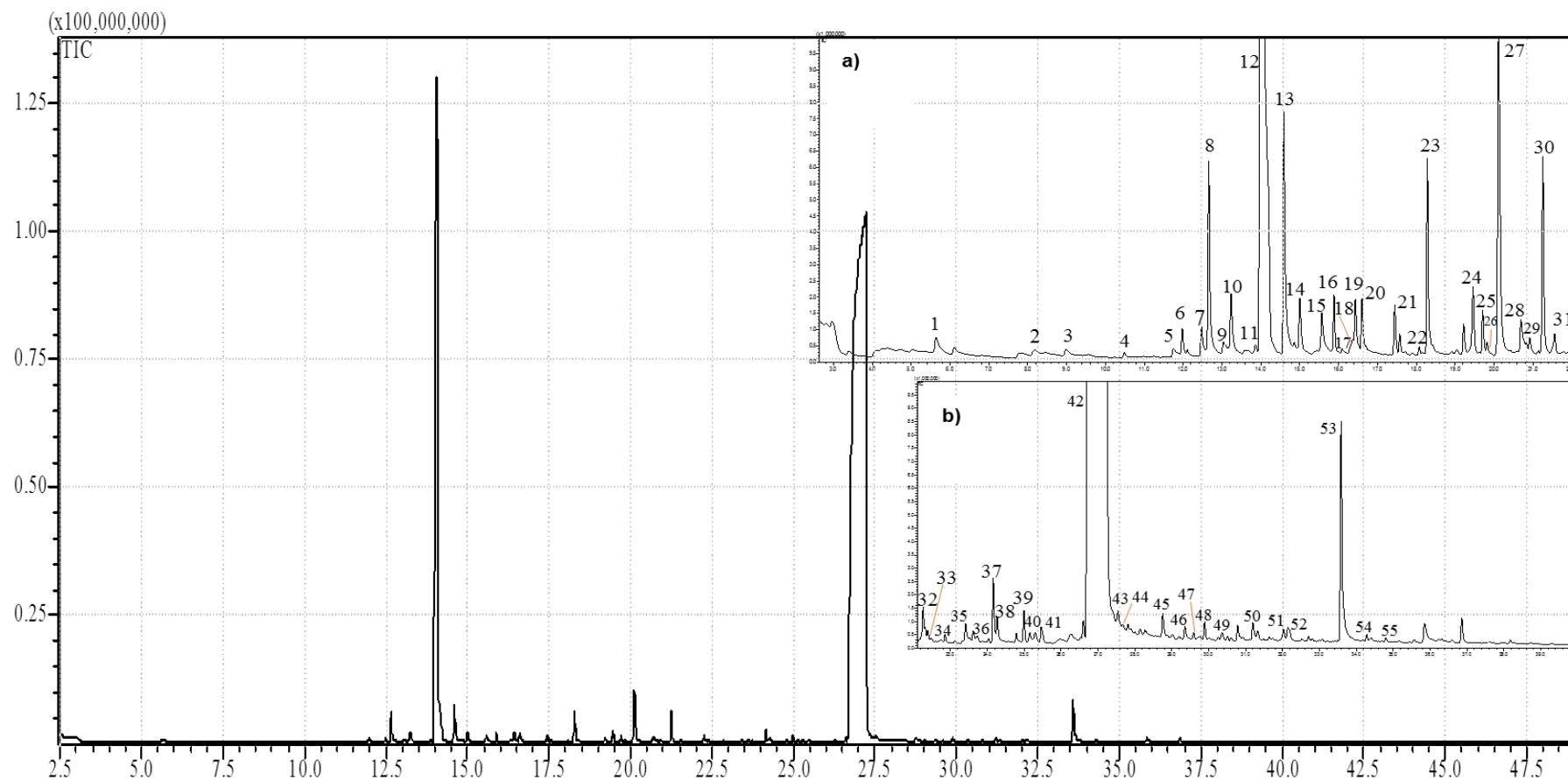


Figura 3.12 – Cromatograma GC-MS da análise realizada com fibra (SPME Fiber Assembly, 50/30 μ m DVB/ CAR/ PDMS, Stableflex (2cm)) ao agrião **a)** zoom 0 - 22 min **b)** zoom 22 – 40 min

Tabela 3.17. – Identificação dos compostos voláteis do Agrião determinados por análise GC-MS

Nº pico	Composto	IR	tR (min)	Área(%)	IS (%)
1	n-Hexanal	805	5,64	0,078	96
2	m-Xileno	871	8,18	0,036	97
3	Estireno	891	8,99	0,037	95
4	α -Pineno	931	10,48	0,016	90
5	Benzaldeído	965	11,74	0,050	96
6	Sabineno	972	11,98	0,075	93
7	β -Pineno	975	12,11	0,014	92
8	β -Mirceno	990	12,66	0,574	94
9	Decano	1000	13,04	0,025	95
10	Octanal	1006	13,23	0,222	89
11	p-Cimeno	1024	13,86	0,021	94
12	Limoneno	1030	14,06	19,551	89
13	Benzacetaldéido	1046	14,59	0,767	97
14	Γ -Terpineno	1058	15,00	0,172	88
15	1-Octanol	1075	15,57	0,126	93
16	Terpinoleno	1084	15,88	0,130	95
17	1-(1-metil vinil)-4-metil-benzeno	1090	16,08	0,011	90
18	n-Pentil Isotiocianato	1096	16,29	0,014	92
19	Linalool	1101	16,43	0,165	87
20	Nonanal	1106	16,60	0,141	92
21	Óxido de Limoneno	1135	17,57	0,047	89
22	Citronelal	1150	18,07	0,018	94
23	4-Metil Pentil Isotiocianato	1157	18,28	0,518	92
24	Dodeceno	1192	19,46	0,221	97
25	Dodecano	1200	19,71	0,114	95
26	2-Butil-1-octanol	1204	19,82	0,030	91
27	Ácido 3-fenil propanóico	1216	20,12	1,113	91
28	Benzenopropanonitrilo	1238	20,69	0,131	97
29	Éster Linalool Ácido Acético	1246	20,92	0,047	92
30	3-Metilexyl Isotiocianato	1259	21,25	0,493	85
31	2,3,5,8-Tetrametil Decano	1271	21,56	0,064	88
32	Tridecano	1300	22,32	0,025	88
33	Nonil Isotiocianato	1302	22,38	0,024	86
34	4,6-Dimetil Dodecano	1320	22,86	0,024	92
35	1-Metiltio Hexano	1341	23,41	0,062	85
36	Diocil-sulfossuccionato de sódio	1353	23,73	0,026	87
37	Benzil Isotiocianato	1369	24,16	0,194	88
38	2-Metil-3-hidroxi-2,4,4-trimetilester do Ácido Propanóico	1373	24,27	0,075	89
39	Tetradecano	1400	24,99	0,097	97
40	Dodecanal	1412	25,29	0,051	89
41	2,3-Dimetil Éster Metílico do Ácido Butanóico	1418	25,46	0,063	86
42	2-Feniletil Isotiocianato	1472	27,22	72,982	92
43	Pentadecano	1500	27,54	0,037	89
44	Miristicina	1506	27,68	0,008	86

Tabela 3.17. – Identificação dos compostos voláteis do Agrião determinados por análise GC-MS (continuação)

Nº pico	Composto	IR	tR (min)	Área(%)	IS (%)
45	1,4-bis(metilíio)-butano	1551	28,75	0,077	86
46	3-Isotiocianatopropil-benzeno	1577	29,35	0,051	88
47	Óxido de Cariofileno	1587	29,59	0,021	92
48	Hexadecano	1600	29,89	0,050	93
49	Éster Metílico do Ácido Laurico	1627	30,51	0,013	86
50	8-Metilíio-1-octanol	1658	31,20	0,066	85
51	5-Heptadeceno	1695	32,03	0,038	88
52	Heptadecano	1700	32,15	0,070	86
53	Éster Metílico do Ácido Pentadecanóico	1766	33,59	0,824	91
54	Ácido Pentadecanóico	1798	34,28	0,017	96
55	Nonadecano	1900	36,86	0,087	96
Total				100 ^(*)	

(*) Contabilizando somente os compostos identificados

Após esta análise, procedeu-se ao estudo dos compostos químicos presentes nos extractos. Tendo como base a determinação de terpenos totais com o método espectrofotométrico, foram escolhidos os extractos TT (que foi especialmente realizado para extracção de compostos voláteis com metodologia Soxhlet), H₂O 6, EtOH 5 e EtOH 13. De modo a se avaliar a influência do solvente de extracção, analisaram-se dois extractos de PG, nas mesmas condições do DOE (PG 5 e PG 13). Para estas identificações e quantificações, optou-se por uma metodologia de injeção da amostra diferente da usada na análise do agrião. Assim sendo, um volume de 1 µL de amostra foi injeção manualmente, recorrendo a uma microseringa, sem derivatização prévia.

- Análise ao Extracto TT

O solvente de extracção utilizado para a obtenção de TT foi uma mistura hidroalcoólica de metanol:água. Os compostos identificados (30 ≈ 94% da área total dos picos), podem ser consultados na tabela 3.18. e o cromatograma resultante desta análise pode ser visualizado na figura 3.13.. Em comparação com os compostos descritos na tabela 3.9., correspondente à análise do agrião, verificou-se que o extracto é muito mais rico em ácidos gordos, sendo o composto mais abundante, com cerca de 39% área relativa do pico, o éster metílico do ácido linolénico, seguido do ácido palmítico, do fitol (composto associado à clorofila) e do ácido margárico. Pereira et al, em 2001, ao analisar o teor de ácidos gordos em vegetais consumidos na Austrália, reportou que o agrião é uma importante fonte de ácidos gordos ômega-3; no mesmo estudo foram identificados no agrião o ácido palmítico, o ácido pentadecanóico, o ácido linoleico e o ácido linolénico. Para além destes, nos compostos identificados para este extracto é possível ainda encontrar o ácido margárico e o ácido oleico. A existência de ésteres metílicos dos ácidos gordos (*fatty acids methyl esters* – FAME's) no extracto resultam da transesterificação dos ácidos gordos com o solvente metanol (Garces & Mancha 1993).

Tabela 3.18. - Identificação dos compostos voláteis do extracto TT determinados por análise GC-MS

Nº pico	Composto	IR	tR (min)	Área(%)	IS (%)
1	Benzeacetaldéido	1048	14,64	0,141	88
2	Citronellal	1172	18,72	0,393	88
3	2,3-dihidro-benzofurano	1223	20,29	2,079	91
4	Benzenopropanonitrilo	1237	20,69	3,224	96
5	Vinil-guaiacol	1310	22,71	2,627	91
6	2-Feniletil Isotiocianato	1465	26,72	0,317	92
7	1,6-Anidro-β-D-glucopiranoose	1493	27,42	1,313	85
8	Hexadecano	1600	29,86	0,827	86
9	6-Pentadecen-1-ol	1699	32,16	0,116	88
10	Tetradecanal	1715	32,52	0,206	91
11	2-Feniletil Éster do Ácido Fórmico	1722	32,67	4,887	87
12	Ácido Mirístico	1765	33,59	0,220	87
13	Neofitadieno	1833	35,01	1,851	96
14	3,7,11,15-tetrametil-2-Hexadeceno	1839	35,13	0,539	91
15	Ácido Pentadecanóico	1877	35,89	0,669	88
16	Ester Metílico do Ácido Palmítico	1925	36,85	0,165	88
17	Octadecen-1-ol	1934	36,98	0,141	92
18	Ácido Palmítico	1965	37,23	10,768	91
19	Ácido Margárico	2078	37,72	6,405	89
20	10,12-heptadecadien-1-ol	2094	40,01	0,176	92
21	9, 12-octadecadien-1-ol	2101	40,12	1,194	85
22	Fitol	2111	40,31	8,887	97
23	Ácido Linoleico	2138	40,80	2,864	92
24	Ester Metílico do Ácido Linolénico	2142	40,94	38,967	91
25	Éster Metílico do Ácido Esteárico	2184	41,63	0,756	87
26	Ácido Esteárico	2282	43,35	0,389	89
27	Éster Metílico do Ácido Araquidónico	2317	43,96	0,529	92
28	1,5-Ciclododecadieno	2354	44,61	0,197	96
29	Ácido 2-metil-2-dimetilamino-2-propanóico	2473	46,69	1,915	92
30	Ácido 1H-indole-3-propanóico	2491	47,02	0,238	87
	Ácido Gordos não identificados (*)		-	0,018	-
	Piperidinas não identificadas (*)		-	0,261	-
	Compostos não identificados		-	5,721	-
Total				100	

(*) Família identificada considerando o pico característico do espectro de massa do composto

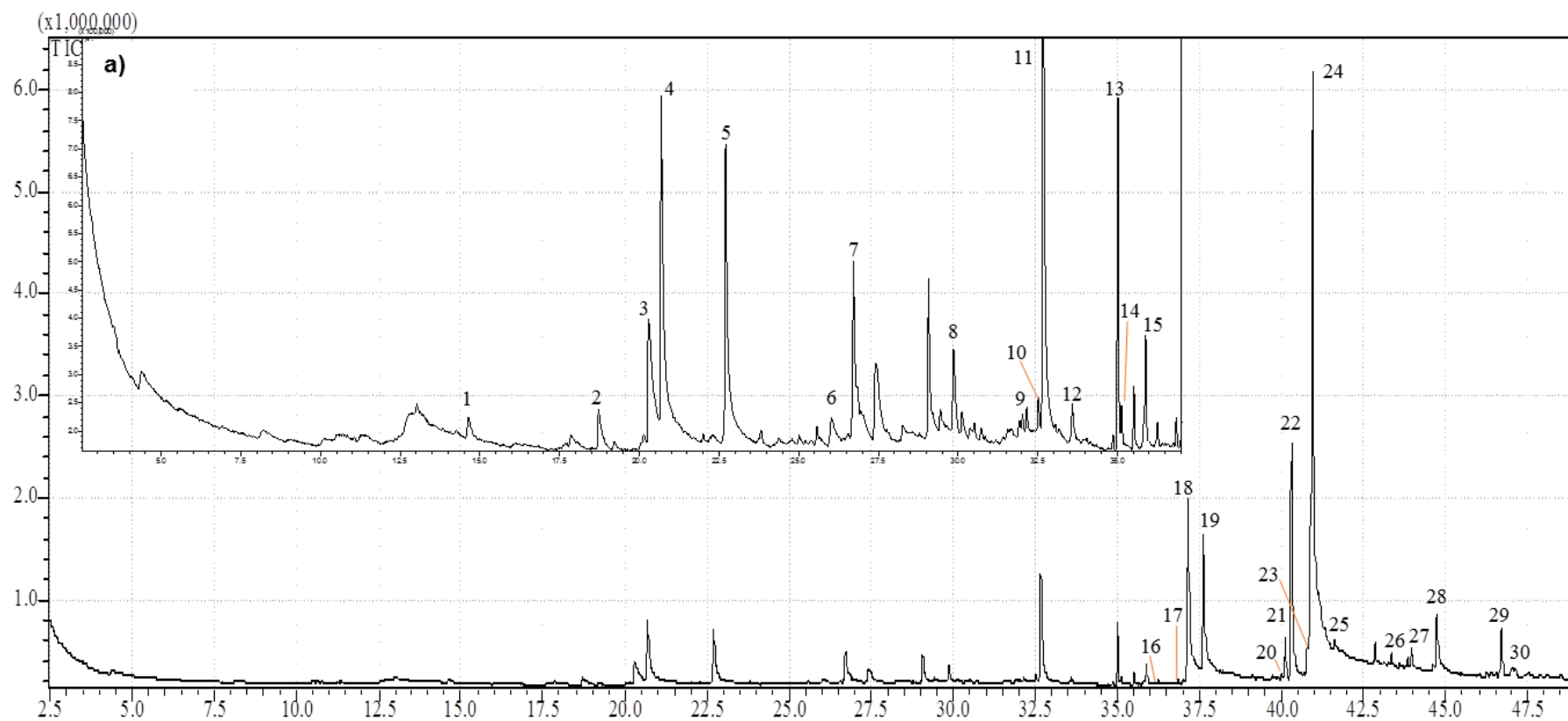


Figura 3. 13.– Cromatograma GC-MS da análise ao extracto TT **a)** zoom 0 – 36 min

- Análise ao Extracto H₂O 6

O cromatograma deste extracto (figura 3.14.) revelou-se bastante mais complexo do que os dois analisados anteriormente, com picos menos definidos e com uma área total menor. Os compostos identificados encontram-se descritos na tabela 3.19..

Tabela 3.19. - Identificação dos compostos voláteis do extracto H₂O 6 determinados por análise GC-MS

Nº pico	Composto	IR	tR (min)	Área(%)	IS (%)
1	n-Pentanal	675	2,54	0,739	92
2	1,2,3,4-Tetrametil-ciclobutano	706	3,04	0,407	87
3	2-Butil-1-hexano	810	5,82	0,292	85
4	2,3-Dimetil-piperidina	929	10,38	1,050	88
5	2-Dimetilamino Etil Ester do Ácido Acético	931	10,48	2,798	94
6	2,3-dihidro-benzofurano	1223	20,48	9,726	92
7	Benzenopropanonitrilo	1237	20,69	1,270	96
8	1H-Indole	1310	22,71	15,560	90
9	Vinil guaiacol	1336	23,39	0,572	87
10	2,6-Dimetoxi-fenol	1348	23,73	0,519	87
11	Éster Metílico de 5-oxo-DL-proline	1383	24,63	1,471	86
12	Tetradecano	1400	25,09	0,561	86
13	2-Feniletilamino-2-metilbutil-dieno	1412	25,39	1,644	92
14	3-Fenil-piridina	1458	26,54	0,581	92
15	2,6-Dimetil-3-(metoximetil)-p-benzoquinona	1474	26,95	1,180	88
16	2-metil-1H-pyrrole	1508	27,78	0,718	89
17	2-Metil-5-oxohexanoato de Metilo	1656	31,21	1,572	86
18	Ácido Glutâmico	1664	31,39	1,559	88
19	5-[1,2,4]Triazol-1-pyrrolidina-2-ona	1692	32,02	7,500	88
20	Leucina	1696	32,10	4,081	86
21	Formato de Fenetila	1719	32,50	3,825	86
22	6-Hidroxi-3-oxo- α -ionona	1747	33,20	2,033	86
23	8-(metiltio)-octanonitrilo	1768	33,65	2,191	87
24	Acetato de Fenetila	1794	34,20	0,599	88
25	Hexahidro-3-(2-metilpropil) Pyrrolo [1,2-a]pyrazina-1,4-diona	1836	35,07	0,712	88
26	Biciclo 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutil (4.3.0) nonano	1916	36,67	0,831	89
27	Ester Metílico do Ácido Palmítico	1921	36,77	0,622	90
28	2,3-dihidro-1H-pyrrolo [2,1]quinazolin-9-ona	1944	37,21	3,323	87
29	Ácido 2-Pyrrolidino Propanóico	1951	37,34	1,809	86
30	2,6-Difenil Piridina	2255	42,88	3,421	87
31	Oleamida	2361	44,74	2,329	89
	Compostos Sulfuricos não identificados (*)		-	1,592	-
	Compostos não identificados			17,080	-
	Contaminantes (coluna, etc.)		-	5,64	-
	Total			100,00	

(*) Família identificada considerando o pico característico do espectro de massa do composto

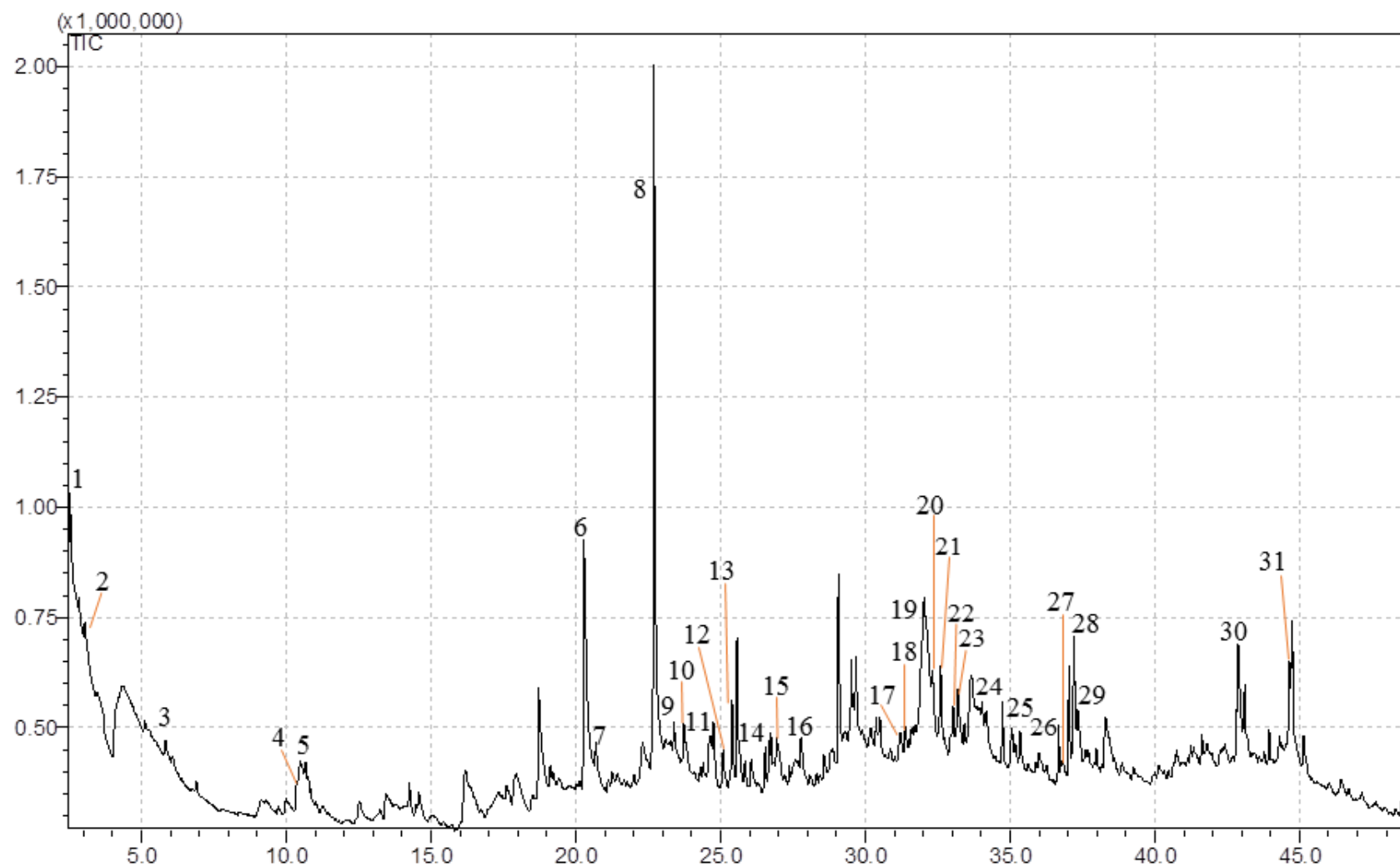


Figura 3.14. - Cromatograma GC-MS da análise ao extracto H₂O 6

Tal como já foi referido, através da observação da tabela anterior confirma-se que este extracto é consideravelmente mais complexo. De um modo geral, a identificação dos compostos foi realizada com IS's menores que 90 %. Os picos no cromatograma são menos marcados, o que se pode dever-se ao facto do extracto estar mais diluído do que seria desejável. No entanto é possível visualizar dois picos que se destacam. Foi identificado o composto 1H Indole, com aproximadamente 15,6% da área total, em tR=22,71 min. Este composto já tinha sido reportado como constituinte do agrião por Spense et al. 1983, na análise de folhas e flores. Os Índoles nas brássicas resultam da conversão dos isotiocianatos, o que justifica a sua presença neste extracto, sendo um dos responsáveis pelo sabor amargo que se sente ao consumir estes vegetais. O segundo composto mais significativo ($\approx 10\%$ da área total) foi identificado como 2,3-dihidrobenzofurano, pertencente à família dos coumaranos. Esse composto foi reportado como possuindo actividade anti-inflamatória e anti-parasítica (Ramalakshmi & Muthuchelian 2011) .

- Análise aos Extractos EtOH 5 e EtOH 13

De modo a verificar a influência das variáveis (X_1) e (X_2) do DOE, partindo da mesma matriz e utilizando o mesmo solvente, os cromatogramas dos dois extractos realizados com Etanol foram analisados em conjunto. Grande parte dos compostos identificados (tabela 3.20.) são comuns aos dois extractos e a comparação dos cromatogramas (figura 3.15.) evidencia as semelhanças na sua composição.

Tabela 3.20. - Identificação dos compostos voláteis dos extractos EtOH 5 e EtOH 13 determinados por análise GC-MS

Nº pico	Composto	IR	EtOH 5			EtOH 13		
			tR (min)	Área (%)	IS (%)	tR (min)	Área (%)	IS (%)
1	1-hidroxi-2-propanona	698	-	-	-	2,82	0,888	93
2	Dihidro-2(3H)-furanona	920	9,59	0,122	88	10,05	0,139	96
3	Benzacetaldeído	1048	14,60	0,310	94	14,63	1,157	92
4	Óxido de Limoneno	1137	17,59	0,098	-	17,61	0,375	86
5	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil- 4H -piran-4-ona	1145	17,84	0,426	94	17,86	1,067	94
6	Citronelal	1171	18,71	0,976	88	18,74	2,260	88
7	Decanal	1203	-	-	-	19,72	0,322	95
8	2,3-dihidro-benzofurano	1222	20,25	5,543	91	20,27	13,057	91
9	Benzenopropanonitrilo	1237	20,67	7,319	96	20,68	24,992	96
10	Vinil-guaiacol	1310	22,70	6,212	92	22,71	15,058	88
11	Disulfeto de sec-butil metil	1451	26,35	0,869	87	26,38	1,214	87
12	2-Feniletíl Isotiocianato	1465	26,71	0,586	92	26,72	3,127	95
13	1,6-Anidro- β -D-glucopiranosose	1491	27,36	0,174	92	27,38	0,185	85

Tabela 3.20. - Identificação dos compostos voláteis dos extractos EtOH 5 e EtOH 13 determinados por análise GC-MS (continuação)

Nº pico	Composto	IR	tR (min)	EtOH 5		EtOH 13		IS (%)
				Área (%)	IS (%)	tR (min)	Área (%)	
14	Pentadecano	1500	27,61	1,980	87	27,60	4,434	86
15	2,4-bis(1,1-dimetiletil) fenol	1507	27,77	0,546	86	27,78	0,804	88
16	8-(metiltio)-octanonitrilo	1527	28,23	0,263	88	28,24	1,133	90
17	3'5'-dimetoxiacetofenona	1562	29,07	2,396	85	29,08	5,320	85
18	Éster Etilico do Ácido Dodecanóico	1625	30,51	0,113	86	30,51	0,212	86
19	Ciclopentadecanol	1692	32,02	0,154	87	-	-	-
20	Tetradecanal	1715	32,52	0,268	92	32,52	0,131	93
21	Octadecano	1790	-	-	-	34,11	0,355	88
22	Neofitadieno	1834	35,02	2,997	96	35,02	0,778	95
23	3,7,11,15-tetrametil-2-Hexadeceno	1840	35,14	0,821	94	-	-	-
24	Ácido Pentadecanóico	1877	35,89	1,600	91	35,89	0,193	88
25	Octadecen-1-ol	1933	37,00	9,683	91	37,01	1,576	86
26	Ácido Palmítico	1964	37,60	8,511	91	37,70	1,539	88
27	Ácido Margárico	2076	39,68	0,400	87	39,70	0,457	88
28	Ester Etilico do Ácido Margárico	2101	40,12	0,089	90	40,12	0,351	86
29	Fitol	2111	40,31	2,156	98	40,31	1,990	98
30	Ácido Linoleico	2139	40,80	1,073	89	40,79	0,335	89
31	Ácido Linolénico	2145	40,93	20,216	88	40,94	1,612	89
32	Éster Etilico do Ácido Oleico	2178	41,63	9,007	88	41,64	5,709	86
33	Hexadecanamida	2189	41,72	0,892	95	41,72	0,181	95
34	Ácido Esteárico	2280	42,75	2,090	90	42,76	0,226	90
35	2,2'-oxybis[N,N-dimetil]-etanamina	2282	43,36	0,592	89	43,36	0,090	86
36	Ácido Araquidónico	2317	43,96	0,445	90	43,96	0,335	89
37	Oleamida	2361	44,74	4,633	92	44,74	1,251	88
38	Propilexedrina	2474	46,71	2,474	89	46,73	0,906	87
39	Ácido 1H-indole-3-propanóico	2492	47,13	0,164	88	-	-	-
40	Éster Etilico do Ácido 2-(hidroxi-1-hidroximetiletil) Hexadecanóico	2577	48,52	0,208	90	-	-	-
Compostos não identificados			-	1,638	-	-	1,267	-
Contaminantes (coluna, etc.)			-	0,232	-	-	1,805	-
Outros compostos				1,623			3,184	
Total				100		Total	100	

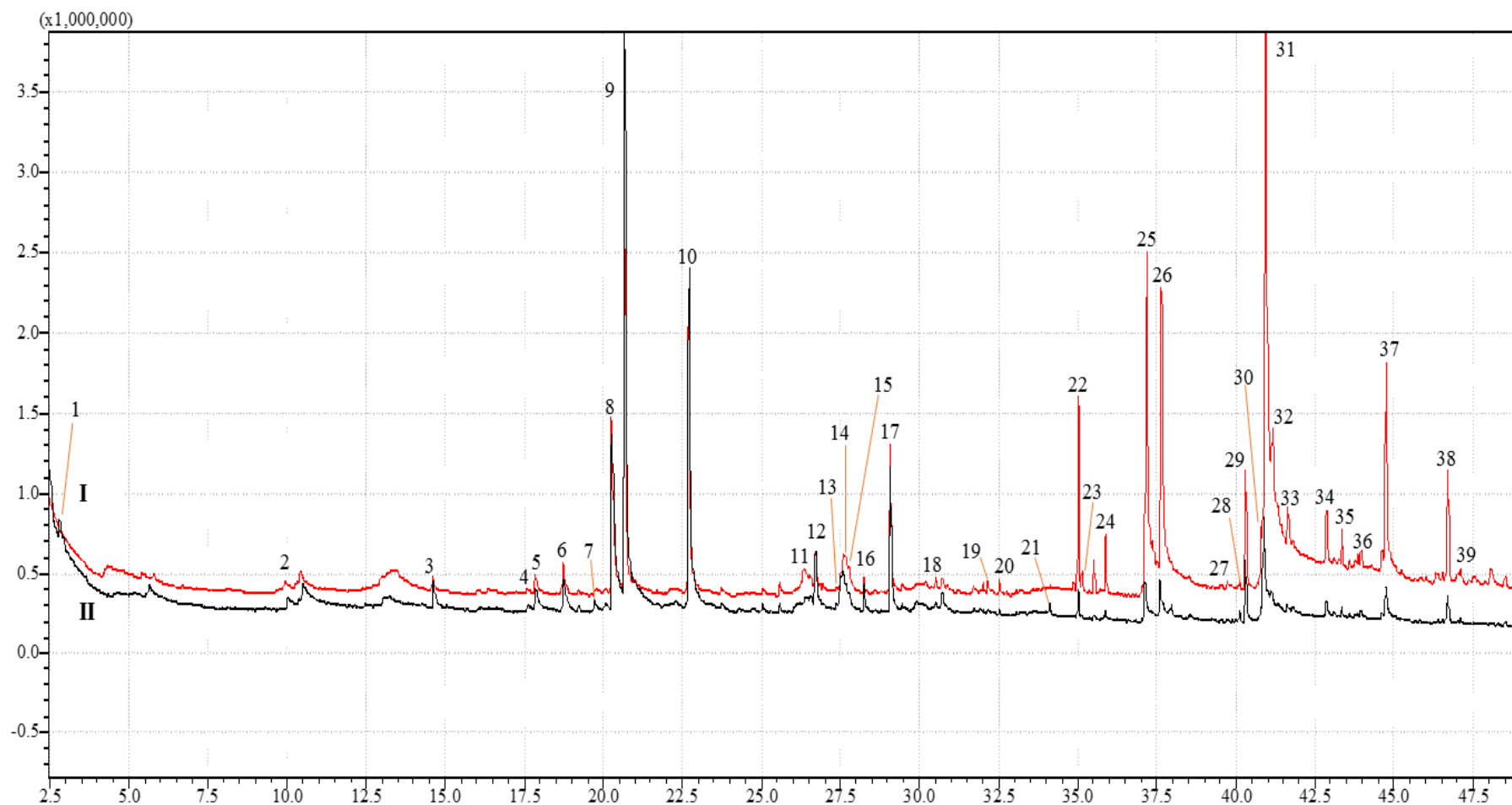


Figura 3.15. - Cromatogramas GC-MS das análises aos extractos **EtOH 5 (I)** e **EtOH 13 (II)**

Globalmente, os compostos identificados nestes extractos são bastante semelhantes aos que constituem o extracto TT (tabela 3.18.). Relembrando as condições de extracção 5 e 13, o extracto EtOH 5 foi preparado com 30 mL de etanol e T=50 °C e em EtOH 13, o agrião foi extraído com 20 mL de etanol a T=80 °C. Estas diferenças de temperatura e volume de solvente adicionado resultaram em disparidades, principalmente no que diz respeito à % da área relativa dos picos, ou seja, na concentração dos compostos em cada um dos extractos. Aparentemente, o extracto EtOH 13 é mais rico em compostos com $t_R \leq 30$ min e EtOH 5 é mais rico em compostos com t_R entre 35 e 47 min. Os principais compostos identificados em EtOH 5 foram ácido linolénico, o octadecen-1-ol, logo seguido do ácido palmítico. No extracto EtOH 13, o benzenopropanonitrilo e o vinil-guaiacol foram os principais compostos identificados. No primeiro, os três compostos descritos apresentaram picos de elevada intensidade, o que leva a concluir que estão provavelmente saturados. Este facto poderá dever-se ao extracto estar mais concentrado do que o desejável, o que também se traduz em picos menos definidos ao longo da corrida. A composição química de EtOH 5 é mais rica em ácidos gordos que EtOH 13, o que permite concluir que, apesar deste último estar mais concentrado (c=5 g/ 20 mL PG), a temperatura mais elevada pode ter resultado na degradação dos ácidos gordos (Tsukamoto et al. 1995). Nestes extractos a esterificação dos ácidos gordos são produtos do metabolismo do etanol (*fatty acids ethyl esters*, FAEE) (Szczepiorkowski & Laposata 2001).

- Análise aos Extractos PG 5 e PG 13

Os extractos de PG foram igualmente examinados em conjunto. Inicialmente, numa primeira análise a um dos extractos de Propilenoglicol, a injeção de 1 µL de amostra resultou na obtenção de um cromatograma com um enorme pico saturado de PG, impossibilitando a visualização de outros compostos no extracto. Deste modo, optou-se por diminuir consideravelmente o volume injectado para 0,1 µL. Mesmo assim, tal como pode ser observado na figura 3.16., o solvente PG continua a apresentar uma elevada % da área total dos picos de cada um dos cromatogramas, não permitindo uma quantificação correcta da área relativa dos picos associados aos restantes componentes químicos nestas amostras. De qualquer forma, foi feita a identificação destes compostos, desconsiderando a presença de PG, e a % da área foi contabilizada. Os resultados encontram-se em duas tabelas diferentes: a primeira, onde é apresentada a comparação da % da área relativa do pico de PG vs. outros compostos (tabela 3.21.); e uma segunda, em que o pico saturado foi removido dos cálculos, possibilitando a identificação e quantificação dos restantes (tabela 3.22.). Futuramente, a evaporação do PG é uma operação a considerar, que não foi realizada por ser um processo bastante moroso e dispendioso, não justificado nesta fase do trabalho.

Tabela 3.21. - Identificação da % área relativa dos picos de PG vs. outros compostos voláteis dos extractos PG 5 e PG 13 determinados por análise GC-MS

Composto	PG 5			PG 13		
	tR (min)	Área	Área (%)	tR (min)	Área	Área(%)
Propilenoglicol (*)	2,72	7,10E+09	99,710	2,52	4,61E+09	99,953
Outros compostos	-	2,07E+07	0,290	-	2,18E+06	0,047
Total		7,12E+09	100	Total	4,61E+09	100,000

(*) No pico do PG foram identificados diversos compostos, entre os quais, o S-(+)-Propilenoglicol (11,5 %), o 2,2-Dideuteropropano (7,5 %), o 2-D2-1-octanal (6,9 %) e o oxybis-metano (5,5 %)

Tabela 3.22. - Identificação dos compostos voláteis dos extractos PG 5 e PG 13 determinados por análise GC-MS

Nº pico	Composto	IR	PG 5			PG 13		
			tR (min)	Área (%)	IS (%)	tR (min)	Área (%)	IS (%)
1	Benzaceteldeído	1048	14,64	62,982	92	-	-	-
2	Nonanal	1107	-	-	-	16,62	1,046	89
3	Decanal	1203	19,72	3,191	95	19,72	5,803	92
4	2,3-dihidro-benzofurano	1223	20,57	2,338	85	-	-	-
5	2-Feniletil Isotiocianato	1465	26,53	14,554	95	26,55	1,647	93
6	2-Feniletil Éster do Ácido Formico	1722	33,66	3,234	88	33,67	0,308	89
7	Hexadecenal	1813	34,60	2,079	91	.	-	.
8	5-Hexadecen-1-ol	1861	-	-	-	35,56	0,798	90
9	l-(+)-Ácido Ascórbico 2,6-dihexadecanoato	1962	37,56	1,357	88	-	-	-
10	Ácido Palmítico	1965	37,62	1,859	91	-	-	-
11	Fitol	2111	39,99	1,100	96	39,97	0,340	96
12	Ácido Linoleico	2139	40,48	1,033	91	40,47	2,003	89
13	Hexadecanamida	2189	41,70	0,944	88	-	-	-
14	Ácido Esteárico	2282	43,36	0,001	87	43,39	0,434	87
15	Ácido 2-metil-2-dimetilamino-2-propanóico	2473	46,68	0,035	90	-	-	-
	Compostos não identificados		-	0,835	-	-	0,311	-
	Contaminantes (coluna, etc.)		-	5,458	-	-	87,310	-
	Total			100		Total	100	

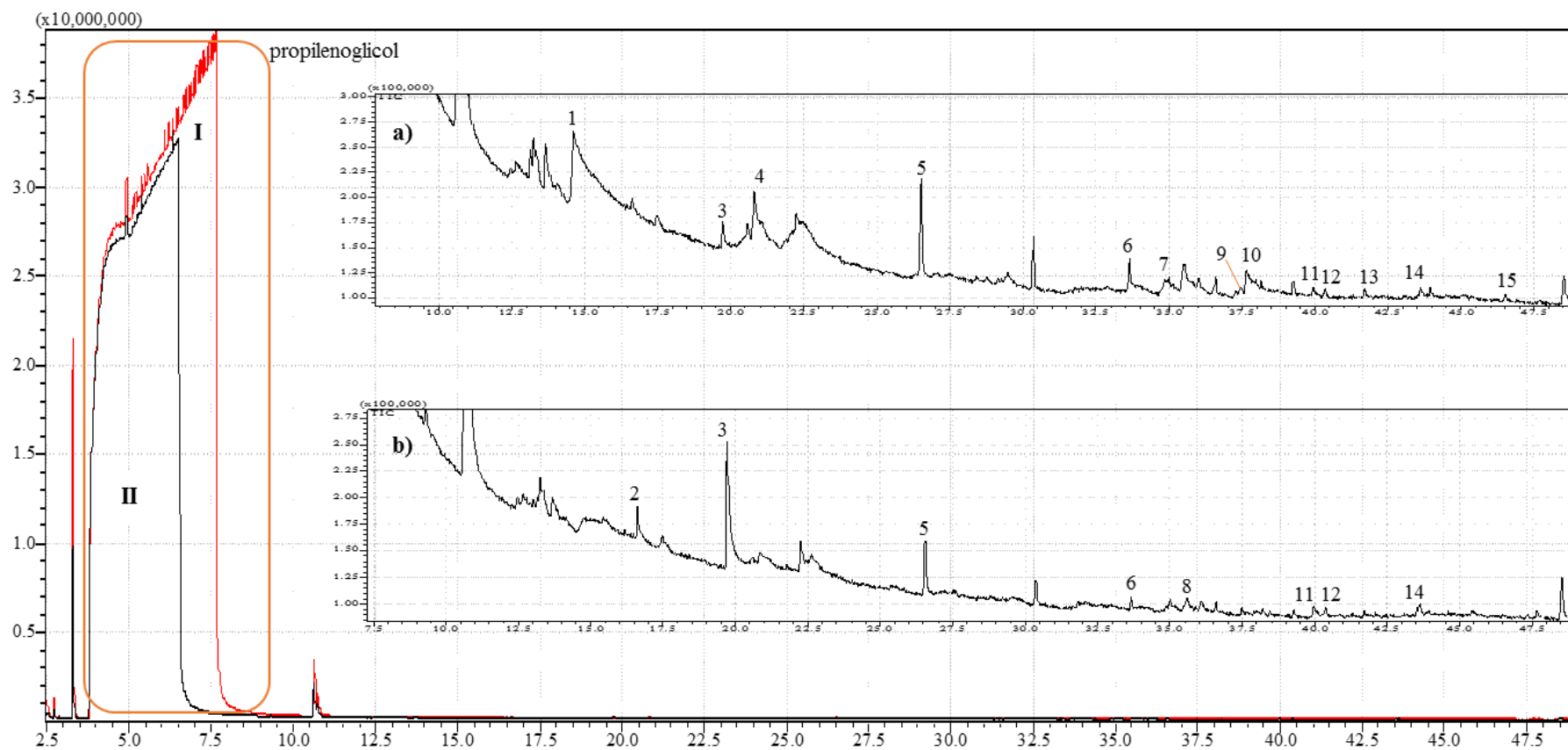


Figura 3.16. - Cromatogramas GC-MS das análises aos extractos **PG 5 (I)** e **PG 13 (II)** a) zoom de I 7,5 – 49 min e b) zoom de II 7,5 – 49 min e

Analisando os compostos descritos na tabela anterior, verificou-se que no extracto PG 13 foram identificados menos compostos, uma vez que ao longo da corrida este ficou muito mais contaminado com vestígios de PG, o que se reflete na % área relativa de contaminante de 89,3 %. A semelhança entre as composições químicas dos extractos não é tão notória, comparando com a visualizada para os dois extractos de EtOH, nas mesmas condições de DOE. Neste caso, existem diversos compostos que não são comuns a PG 5 e PG 13, nomeadamente o ácido palmítico, o l-(+)-ácido ascórbico 2,6-dihexadecanoato e o éster etílico do ácido linoleico, que somente estão presentes no PG 5. Mais uma vez, tal como aconteceu com os extractos de EtOH, a temperatura mais baixa favorece a extração deste tipo de compostos. Os principais compostos identificados em PGH 5 foram o benzenacetaldéido e o 2-feniletil isotiocianato. No extracto PG 13, os aldeídos nonanal e decanal foram os principais compostos identificados. A existência destes aldeídos na matriz agrião já tinha sido reportada anteriormente por Spence et al, em 1982, com % relativa de 1,2 e 0,2%, respectivamente, em quantificação por GC, após extração das folhas e caules de agrião com éter dietílico.

Globalmente, olhando para a composição dos extractos analisados, no que toca a compostos voláteis, verificou-se que não foi possível a identificação dos terpenos, que eram os fitoquímicos – alvo. Apesar da análise ao agrião permitir concluir que a matriz é rica em terpenos, especialmente limoneno, nos cromatogramas dos extractos estudados nenhum dos 50 picos mais importantes tem tempo de retenção próximo dos 14 minutos (tempo de retenção do limoneno com o programa/ coluna cromatografia utilizada). Tal facto indica que provavelmente a concentração de terpenos nos extractos é tão pouco significativa que através desta análise, não foi possível a sua identificação. Por outro lado, pode ter ocorrido perdas destes compostos na preparação dos extractos. Os terpenos são altamente voláteis e num trabalho futuro este é um aspecto a ter em maior consideração. Uma extração convencional com solvente, mesmo utilizando um condensador para evitar perda de voláteis, tal como praticado, não se revelou como sendo uma metodologia eficaz para a obtenção deste tipo de compostos. Para além disso, a evaporação do solvente recorrendo a um evaporador rotativo também pode ter conduzido à escassez de terpenos nos extractos analisados.

3.5. Avaliação do potencial para aplicação em Cosmética

3.5.1. Actividade enzimática

O estudo da actividade enzimática tendo em vista aplicação dos extractos em indústria de cosméticos foi realizado através de dois ensaios distintos.

A investigação da inibição da actividade da enzima Tirosinase foi realizada para se concluir se o agrião possui acção anti-pigmentante. Para tal, foram escolhidos os extractos PF, TT, H₂O 6, H₂O 7, EtOH e PG nas condições 5, 9, 10, 13, 14 e 15, considerando os resultados obtidos na caracterização da matriz e de modo a ver se houve influência do solvente utilizado na extração. Cada extracto foi colocado directamente na placa (sem qualquer diluição) com n = 2 (cada análise foi realizada em duplicado). Os resultados obtidos podem ser consultados na tabela 3.23.

Tabela 3.23 – Valores de % de inibição da tirosinase para os diferentes extractos testados.

Extracto	Inibição Tirosinase (%)	Média	DP	Extracto	Inibição Tirosinase (%)	Média	DP
PT	66	62,5	4,95	TT	86	86	0,00
	59				86		
H₂O 6	18	15	4,24	H₂O 7	5	4,5	0,71
	12				4		
EtOH 5	84	82,5	2,12	PG 5	-4	-4	0,00
	81				-4		
EtOH 9	53	53,5	0,71	PG 9	-28	-26,5	2,12
	54				-25		
EtOH 10	36	37	1,41	PG 10	-51	-54,5	4,95
	38				-58		
EtOH 13	9	10	1,41	PG 13	-32	-29,5	3,54
	11				-27		
EtOH 14	64	58,5	7,78	PG 14	-24	-28	5,66
	53				-32		
EtOH 15	49	48	1,41	PG 15	-37	-38	1,41
	47				-39		

Tal como já foi referido no ponto 1.6.1, da Introdução Teórica, a bibliografia reporta que o extracto de agrião detém actividade inibitória da TYR. Ao considerar cada tipo de solvente, a análise dos resultados obtidos permitiu logo à partida afirmar que os extractos contendo PG não têm actividade inibitória da tirosinase. Todos os restantes (MeOH, H₂O e EtOH) possuem % de inibição da enzima tirosinase, extraída de cogumelos, a variar entre 4,5 e 86 %. Os valores mais baixos de inibição surgem associados ao extracto de água. Considerando que somente a variável temperatura difere entre os dois extractos de H₂O, colocou-se a hipótese de temperaturas mais elevadas (80 °C em H₂O 7) serem menos favoráveis para a extracção de compostos associados à inibição da enzima com a água. Olhando para os extractos do DOE EtOH: H₂O, também se verificou que EtOH 13 (T=80 °C) possuiu menor % inibição, mesmo quando comparado com H₂O 6 (T=20 °C). Comparando as duas temperaturas inferiores, constatou-se que T=50 °C é a temperatura óptima para extracção de compostos que actuam como inibidores da TYR. Em vegetais, estes compostos são principalmente α -arbutina, β -D-glucopiranosido, ácido kójico, ácido salicílico, hidroquinonas, catequinas ou resveratrol (Kamkaen et al. 2007). No caso das brássicas, também se pode atribuir aos isotiocianatos a acção inibitória da enzima (Shirasugi et al. 2010). Recordando a caracterização fitoquímica dos extractos estudados, observou-se que EtOH 5 (extracto dos DOE's que possui % de inibição mais elevada) tinha uma combinação interessante de alguns dos compostos enumerados, nomeadamente β -D-glucopiranosose e 2-feniletilisotiocianato. Para comprovar quais os compostos presentes nos extractos agrião que são responsáveis pela sua acção anti-pigmentante, os extractos teriam de ser estudados mais exaustivamente. Analisando os outros factores dos DOE's, uma maior quantidade de solvente utilizado na extracção, isto é uma razão matriz:solvente de 1:6, favoreceu a extracção destes compostos (comparação entre EtOH 5 (1:6) e EtOH 14 (1:2)). Por outro lado, o uso de somente etanol (EtOH 5) promoveu a obtenção de um extracto que favoreceu a inibição da tirosinase, quando comparado com a utilização de uma mistura hidroalcoólica (EtOH 15). Para extracto TT determinou-se a % de inibição da TYR mais elevada,

ligeiramente superior a EtOH 5. Comparando estas duas extracções e os cromatogramas anteriormente analisados, sabe-se que a composição de ambos os extractos é bastante semelhante, no que respeita ao tipo de compostos presentes. Tal como já explicado a quantificação dos mesmos não foi possível. Deste modo, não se pode concluir com certeza o motivo para a maior actividade anti-pigmentante do extracto TT.

A averiguação da apetência do agrião na acção anti-rugas foi testada através da capacidade inibitória da enzima MMP-1 dos extractos. Para tal, foram escolhidos 3 extractos, cada um deles obtido com um solvente diferente, tendo em consideração as análises realizadas anteriormente. Os extractos H₂O 6, EtOH 5 e PG 5 foram utilizados neste ensaio enzimático. Cada análise foi realizada em duplicado. Os resultados estão descritos na tabela 3.24.

Tabela 3.24. – Valores de % de inibição da MMP-1 para os extractos testados.

Extracto	Inibição MMP-1 (%)	Média	DP
H ₂ O 6	63,9	64,5	0,85
	65,1		
EtOH 5	48,1	45,8	3,32
	43,4		
PG 5	35,3	33,8	2,12
	32,3		

Os três extractos foram testados com uma diluição de 1:2 em tampão Tris-HCl, uma vez que uso directo do extracto forneceu valores de inibição acima dos 100%. Todos eles mostraram possuir acção inibitória da enzima MMP-1, sendo somente o extracto de água inibe mais de 50% da actividade da enzima. Através da literatura sabe-se que a enzima MMP-1 é segregada por fibroblastos da pele humana e está envolvida na degradação do colagénio e danos resultantes no processo de foto-envelhecimento (Quan et al. 2010), tal como já descrito na secção 1.6.2. Existem diversos mecanismos de inibição e/ ou regulação de MMP's. A inibição da enzima com os extractos poderá ter acontecido por interacção com um composto activo Zn²⁺, por clivagem da enzima activa ou por ligação a uma forma complexa não activa. Os resultados sugerem que os extractos de agrião testados contêm um inibidor endógeno de metaloproteínases (TIMP). Os TIMP's, especificamente o TIMP-3 para a MMP-1, ligam-se à enzima dando origem a uma forma TIMP-3 - MMP-1 não covalente, bloqueado a clivagem do substrato (Visse & Nagase 2003). A actividade inibitória da MMP-1 e a sua contribuição para a redução da foto-degradação não era conhecida para extractos de agrião. No entanto, alguns autores reportaram que amostras vegetais, tais como, chá branco, chá verde, *Sanguisorba officinalis*, e flavonóides possuem acção inibitória desta enzima (Azmi et al. 2014).

3.5.2. Absorção cutânea

Para o estudo da absorção cutânea recorreu-se à quantificação de um dos compostos fenólicos identificados cromatograficamente pela análise de HPLC (ácido p-cumárico e ácido ferúlico). Recordando os cromatogramas das amostras analisadas escolheu-se para este ensaio de absorção cutânea quantificar o ácido p-cumárico do extracto H₂O 7, por ser aquele em que o teor do referido composto era mais elevado.

A concentração de 1ppm de padrão p-cumárico foi analisado no LC-MS com MRM (figura 3.17.).

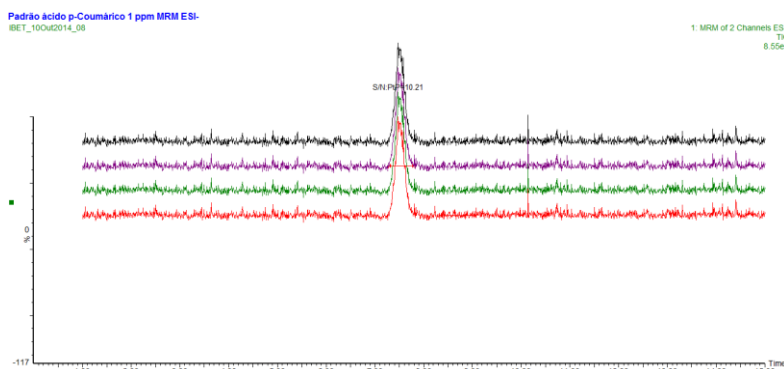


Figura 3.17. – Cromatograma MRM do padrão ácido p-cumárico (1 ppm)

Em seguida foram analisados o extracto H₂O 7 e os pontos retirados a 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h e 24h do ensaio de absorção na célula de Franz. O limite de detecção foi 0,33 ppm e o limite de quantificação foi 1 ppm.

Os cromatogramas resultantes podem ser analisados na figura 3.18.

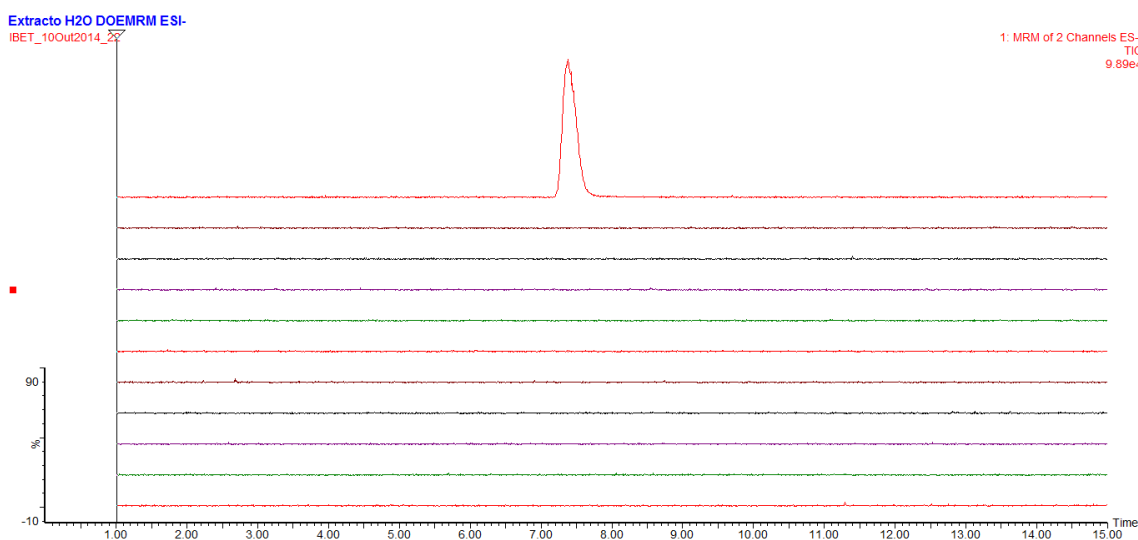


Figura 3.18. – Cromatogramas MRM do extracto H₂O 7, 24h, 8h, 7h, 6h, 5h, 4h, 3h, 2h, 1h e branco

Pela interpretação dos cromatogramas da figura anterior, verificou-se que não foi possível a detecção do ácido p-cumárico nos pontos recolhidos ao longo das 24 horas do ensaio de absorção cutânea, sendo no entanto bem visível a sua presença na composição de H₂O 7. A quantificação do p-cumárico no extracto revelou uma concentração de 10,7 ppm (10,7 mg/L).

Com os resultados obtidos, colocou-se a questão se a concentração de p-cumárico nos pontos do ensaio era inferior ao limite de detecção ou se o composto não foi absorvido pela membrana. Sabendo que o extracto em análise possuía 10,7 mg de ácido p-cumárico /L de extracto, e tendo em conta que no ensaio de absorção apenas se testou 1 mL de H₂O 7, este volume somente continha aproximadamente 0,0107 mg do composto. Importou ainda considerar os 15 mL de PBS no interior da célula de Franz, que contribuíram para a diluição das amostras. Deste modo, conclui-se que mesmo podendo ter ocorrido absorção pela membrana Strat-M, a detecção e posterior quantificação de p-cumárico não seria exequível.

Futuramente de modo a demonstrar se é legítimo afirmar que o extracto de agrião consegue ser transportado através da pele, o ensaio terá de ser optimizado, testando a utilização de maior volume de extracto, a utilização de um extracto com maior teor do composto em análise ou experimentando a concentração dos pontos, após ensaio de absorção e antes da análise de detecção e quantificação.

4. Conclusão

Neste trabalho, foi desenvolvido um método de extração para o agrião, recorrendo a metodologias “limpas”, para recuperação de compostos bioativos com aplicação na indústria dos nutracêuticos. A matriz foi inicialmente caracterizada, com a três extrações, cada uma delas com a finalidade de obtenção de extractos ricos em compostos-alvo previamente definidos (compostos fenólicos, terpenos e carotenóides). Utilizando um desenho de experiências (DOE) com metodologia de superfície de resposta e estabelecendo como variáveis temperatura (20-80 °C), razão matriz:solvente (1:2-1:6) e razão água:solvente (0-1), foram planeadas e elaboradas 26 extrações, utilizando duas soluções água:co-solventes GRAS (EtOH e PG). Todos os extractos obtidos foram caracterizados fitoquimicamente por métodos espectrofotométricos e foi determinada a sua actividade antioxidante por mecanismos de fluorescência (ORAC, HORAC e HOSC). Dos extractos do DOE EtOH:H₂O, o extracto H₂O 7 foi aquele que revelou ter maior teor de PT (1,22 mg EAG/ g m.f.) e maior actividade antioxidante pelo mecanismo de HORAC (11,64 µmol EAC/ g m.f.); para os restantes mecanismos de actividade antioxidante, EtOH:H₂O 15 deteve valor de ORAC mais elevado (17,58 µmol ET/ g m.f.) e EtOH 13 apresentou valor de HOSC mais elevado (16,45 µmol ET/ g m.f.); no que respeita a TT, EtOH 5 e EtOH 13 revelaram ter a mesma concentração, 0,15 mg EL/ g m.f.. As equações polinomiais do modelo determinadas para o DOE EtOH:H₂O, R² e R_{ajust}² elevados (≥0,92) para PT, HORAC e HOSC sugerem uma estreita concordância entre os dados experimentais e os valores teóricos previstos pelo modelo. Os extractos do DOE PG:H₂O evidenciaram composição mais abundante em polifenóis totais e em actividade antioxidante do que os extractos do DOE EtOH:H₂O. A condição 13 deste DOE exibiu melhores resultados quer para o teor em PT (1,55 mg EAG/ g m.f.), quer para os tres mecanismo de actividade antioxidante investigados (ORAC = 39,31 µmol ET/ g m.f., HORAC = 14,36 µmol EAC/ g m.f. e HOSC = 28,97 µmol ET/ g m.f.); relativamente à quantificação de carotenóides, somente foi possível realizar no extractos em que o solvente de extração foi 100% PG, com PG 5 a revelar ser o extracto mais rico neste tipo de compostos com 1,91 mg Eβ-c/ 100 g m.f.. O tratamento estatístico dos resultados, evidenciou coeficientes de correlação, R² e R_{ajust}², elevados (>0,65) para todas as respostas estudadas, sugerindo concordância entre os dados experimentais e os valores teóricos previstos pelo modelo. O modelo polinomial ajustado foi validado através da comparação dos polifenóis totais obtidos experimentalmente, para as extrações com as condições óptimas fornecidas pelo *software*, com os previstos pelo modelo, resultado em erros relativos percentuais inferiores a 5 %. A caracterização cromatográfica dos extractos exibiu que o agrião é uma matriz complexa, rica em compostos fenólicos, nomeadamente flavonóides (derivados de quercetina, derivados de canferol, etc.), ácidos fenólicos (ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, etc.). Para além dos fenóis, a análise da composição volátil evidenciou a presença de terpenos (limoneno, β-mirceno, β-pineno, etc.); de alcanos; de isotiocianatos, principalmente o 2-feniletil isotiocianato; de aldeídos (octanal, nonal, decanal, citrônella, etc.); e de ácido gordo e seus ésteres (ácido linoleico, ácido linolénico, ácido palmítico, etc.). A avaliação do potencial cosmeceútico revelou que o agrião possui acção anti-pigmentante e anti-rugas.

Este trabalho de investigação mostrou que o Agrião é uma promissora fonte natural de numerosos fitoquímicos, que possui distintos mecanismo de actividade antioxidante e detêm potencial para ser incluído em cosmecêuticos.

Em trabalhos futuros seria interessante explorar a toxicidade dos extractos e a sua actividade anti-bacteriana, avaliar outras vertentes da sua potencialidade cosmecêutica, tais como, a acção anti-acne . Seria ainda relevante investigar a encapsulação dos extractos e a posterior formulação de cosmecêuticos.

5. Referências Bibliográficas

- Acree, T. & Arn, H., Flavornet and human odor space. Available at: <http://www.flavornet.org/flavornet.html> [Accessed July 22, 2014].
- Adams, R.P., 2007. Alphabetical listing of compounds with their retention time and arithmetic arithmetic index on DB 5. In *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. USA: Allured Books, p. 804.
- Ahmed, F. a & Ali, R.F.M., 2013. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh and processed white cauliflower. *BioMed Research International*, 2013
- Aires, A. et al., 2013. Phytochemical characterization and antioxidant properties of baby-leaf watercress produced under organic production system. *CyTA - Journal of Food*, 11(4), pp.343–351.
- Al-jumaily, E.F. & Al-amiry, M.H.A., 2012. Extraction and Purification of Terpenes from Nutmeg (*myristica fragrans*). *Journal of Al-Nahrain University*, 15(3), pp.151–160.
- Al-shehbaz, I. & Price, R.A., 1998. Delimitation of the genus *Nasturtium* (*Brassicaceae*). *Novon*, 8, pp.124–126.
- Amiri, H., 2012. Volatile constituents and antioxidant activity of flowers, stems and leaves of *Nasturtium officinale* R. Br. *Natural Product Research*, 26(2), pp.109–115.
- Ansorena, D. et al., 2001. Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. *Food Research International*, 34(1), pp.67–75.
- Arbos, K.A., 2004. *Estudo do Potencial Antioxidante da Família Cruciferae de Diferentes Cultivos*. Universidade Federal do Paraná.
- Ares, A.M., Nozal, M.J. & Bernal, J., 2013. Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. *Journal of Chromatography. A*, 1313, pp.78–95.
- Azmi, N. et al., 2014. Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(Suppl 1), pp.S348–352.
- Bahramikia, S. & Yazdanparast, R., 2010. Antioxidant efficacy of *Nasturtium officinale* extracts using various in vitro assay systems. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 3(4), pp.283–290.
- Baş, D. & Boyacı, İ.H., 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), pp.836–845.
- Baumann, L., 2007. Skin ageing and its treatment. *Journal of Pathology*, 211, pp.241–251.
- Bidlack, W.R. et al., 2000. *Phytochemicals as Bioactive Agents* 1st Editio., USA: CRC Press.
- Bizzo, H., Hovell, A. & Rezende, C., 2009. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 32(3), pp.588–594.
- Boligon, A.A. et al., 2013. HPLC Analysis of Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity in *Nasturtium officinale*. *International Journal of Food Properties*, 16(1), pp.61–69.
- Briganti, S., Camera, E. & Picardo, M., 2003. Innovative Technology Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*, 16, pp.101–110.

- Carvalho, J.S., 2001. *Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do Nasturtium officinale R. BR., BRASSICACEAE*. Universidade Federal do Paraná.
- Chan, E.W.C. et al., 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, 109(3), pp.477–483.
- Chanchal, D. & Swarnlata, S., 2008. Novel approaches in herbal cosmetics. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 7(2), pp.89–95.
- Chew, B.P. & Park, J.S., 2004. Functions and Actions of Retinoids and Carotenoids : Building on the Vision of James Allen Olson Carotenoid Action on the Immune Response 1. *The Journal of Nutrition*, pp.257–261.
- Ciccone, M.M. et al., 2013. Dietary intake of carotenoids and their antioxidant and anti-inflammatory effects in cardiovascular care. *Mediators of Inflammation*, 2013, pp.1-12
- CIR, 1993. *Final Report on Safety Assessment of Propylene Glycol*, Washington, DC.
- Costain, L., 2012. Watercress - The original superfood. *The Watercress Alliance*, p.16.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. & Lewis, N.G., 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones, eds. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, pp. 1250–1318.
- Dai, J. & Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(10), pp.7313–7352.
- Dillard, C.J. & German, J.B., 2000. Review Phytochemicals : nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, pp.1744–1756.
- Donaldson, M.S., 2004. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal*, 3, p.19.
- Doneva-Sapceska, D. et al., 2006. FREE AND POTENTIALLY VOLATILE MONOTERPENES IN GRAPE VARIETIES. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, 25(1), pp.51–56.
- Dow, C.C., 2000. *Purity Dow Propileno Glicol USP / EP*, Midland, Michigan.
- Durazzo, A. et al., 2013. Italian Wild Rocket [*Diplotaxis Tenuifolia* (L.) DC.]: Influence of Agricultural Practices on Antioxidant Molecules and on Cytotoxicity and Antiproliferative Effects. *Agriculture*, 3(2), pp.285–298.
- Duyn, M.A., 2000. Overview of the health benefits of fruit and vegetable.pdf. *Journal of the American Dietetic Association*, 100, pp.1511–1521.
- EC, 2004. *Guidance Document on Dermal Absorption*, European Union: European Commission - Health and Consumer Protection.
- El-Sayed, A., 2003. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Available at: www.pherobase.com [Accessed July 22, 2014].
- EPCE, 2006. *Directive 2006/1924/EC, relating to the nutrition and health claims made on foods*, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Feliciano, R.P. et al., 2008. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Moscatel Dessert Wines from the Setúbal Region in Portugal. *Food Analytical Methods*, 2(2), pp.149–161.

- Fernandes, F. et al., 2007. Chemical and antioxidative assessment of dietary turnip (*Brassica rapa* var. *rapa* L.). *Food Chemistry*, 105(3), pp.1003–1010.
- Finley, J.W. et al., 2011. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), pp.6837–6846.
- Garces, R. & Mancha, M., 1993. One-Step Lipid Extraction and Fatty Acid Methyl Esters Preparation from Fresh Plant Tissues. *Analytical Biochemistry*, 211(1), pp.139–143.
- Gill, C. et al., 2007. Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), pp.504–510.
- Halliwell, B., 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, pp.33–50.
- Harborne, J.B., 1999. *Classes and Functions of Secondary Products from Plants* N. J. Walton & D. E. Brown, eds., London: Imperial College Press.
- Harbourne, N. et al., 2014. Conventional extraction techniques for phytochemicals. In B. K. Tiwari, N. P. Brunton, & C. S. Brennan, eds. *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 398–411.
- Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I. & Lajolo, F.M., 2005. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), pp.2928–2935.
- Hounsome, N. et al., 2008. Plant Metabolites and Nutritional. *JFS R: Concise Reviews/Hypotheses in Food Science*, 73(4), pp.48–65.
- Huang, D. et al., 2002. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp.4437–4444.
- Inomata, S. et al., 2003. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, 120, pp.128–134.
- Isabelle, M. et al., 2010. Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chemistry*, 120(4), pp.993–1003.
- Jahangir, M. et al., 2009. Health-Affecting Compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), pp.31–43.
- Jones, A. & Duerbeck, K., 2004. *Natural Ingredients for Cosmetics*.
- Justesen, U. & Knuthsen, P., 2001. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, 73, pp.245–250.
- Kaliora, A.C. et al., 2014. Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? *Food Chemistry*, 142, pp.233–241.
- Kalt, W., 2005. Effects of Production and Processing Factors on Major Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, 70(1), pp.R11–R19.
- Kamkaen, N., Mulsri, N. & Treesak, C., 2007. Screening of Some Tropical Vegetables for Anti-tyrosinase Activity. , 2(1), pp.15–19.

- Kantoff, P., 2006. Prevention , Complementary Therapies , and New Scientific Developments in the Field of Prostate Cancer. *MedReviews - REVIEWS IN UROLOGY*, 8(2), pp.9–14.
- Kim, M. et al., 2012. Screening of plant extracts for human tyrosinase inhibiting effects. *International Journal of Cosmetic Science*, 34(2), pp.202–208.
- Kim, M.-M. et al., 2006. Phlorotannins in Ecklonia cava extract inhibit matrix metalloproteinase activity. *Life Sciences*, 79(15), pp.1436–1443.
- Kimura, M. & Rodriguez-Amaya, D.B., 2003. Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), pp.2603–2607.
- Koichiro, T. & Aki, I., 2002. Patent No. 2003-313113 Hair Grower.
- Kopsell, D. et al., 2007. Influence of nitrogen and sulfur on biomass production and carotenoid and glucosinolate concentrations in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), pp.10628–10634.
- Lako, J. et al., 2007. Phytochemical flavonols , carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*, 101(4), pp.1727–1741.
- Lim, T., Lim, Y. & Yule, C., 2009. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four Macaranga species. *Food Chemistry*, 114(2), pp.594–599.
- Lin, L.-Z. & Harnly, J.M., 2013. Phenolic Component Profiles of Mustard Greens, Yu Choy and 15 other Brassica Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), pp.6850–6857.
- Macleod, A.J. & Isla, R., 1975. Volatile Flavour Components of Watercress. *Journal of Science and Food Agriculture*, 26, pp.1545–1550.
- Makoto, E. et al., 2001. Patent No. 2001-181120 Skin care preparation.
- Maran, J.P. et al., 2013. Box-Behnken design based multi-response analysis and optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from tea (*Camellia sinensis* L.) leaves. *Journal of Food Science and Technology*. p. 13
- Martínez-Sánchez, A. et al., 2008. A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf Brassicaceae species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(7), pp.2330–40.
- MassBank, 2006. MassBank - High Quality Mass Spectral Data Base. Available at: <http://www.massbank.jp/SearchPage.html> [Accessed July 26, 2014].
- Miguel, L.M., 2011. Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França. *Revista Geográfica de América Central*, II, pp.1–15.
- Moore, J., Yin, J.-J. & Yu, L.L., 2006. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical scavenging capacity (HOSC) estimation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), pp.617–626.
- Mozaffarieh, M., Sacu, S. & Wedrich, A., 2003. The role of the carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degeneration: a review based on controversial evidence. *Nutrition journal*, 2, p.20.
- Mulinacci, N. et al., 2006. Evaluation of lignans and free and linked hydroxy-tyrosol and tyrosol in extra virgin olive oil after hydrolysis processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(5), pp.757–764.

- Ng, S.-F. et al., 2010. Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies. *AAPS PharmSciTech*, 11(3), pp.1432–1441.
- NIST, 2011. Webbook - National Institute Standards and Technology. *Webbook NIST - U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America*. Available at: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> [Accessed July 30, 2014].
- O'Neill, M.E. et al., 2001. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *British Journal of Nutrition*, 85, pp.499–507.
- OECD, 2004. *Test guideline for the testing of chemicals 428 - Skin absorption: in vitro method*, The Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Orcutt, D.M. & Nielsen, E., 2000. *The physiology of plants under stress soil and biotic factors* 1st ed. J. W. and Sons, ed., New York: Wiley.
- Ou, B. et al., 2002. Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe. , 50, pp.2772–2777.
- Palaniswamy, U.R. et al., 2003. Ontogenic variations of ascorbic acid and phenethyl isothiocyanate concentrations in watercress (*Nasturtium officinale* R.Br.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), pp.5504–5509.
- Palthur, M.P., Palthur, S.S. & Chitta, S.K., 2010. Nutraceuticals: concept and regulatory scenario. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(2), pp.14–20.
- Paredes-López, O. et al., 2010. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life--a review. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 65(3), pp.299–308.
- Pereira, C., Li, D. & Sinclair, J., 2001. The alpha-linolenic acid content of green vegetables commonly available in Australia. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 71(4), pp.223–228.
- Podsędek, A., 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), pp.1–11.
- Practitioner, G., 2009. Approach to Anti-aging. , 51(1), pp.68–72.
- Quan, T. et al., 2010. Matrix-degrading Metalloproteinases in Photoaging. , 14(1), pp.20–24.
- Quideau, S. et al., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(3), pp.586–621.
- Rahn, C., 2009. *Cell Active® - WHITE: Lightening Skin Care*, Zurich.
- Ramalakshmi, S. & Muthuchelian, K., 2011. Analysis of Bioactive constituents from the Ethanolic leaf extract of *Tabebuia rosea* (Bertol .) DC by Gas Chromatography – Mass Spectrometry. *International Journal of ChemTech Research*, 3(3), pp.1054–1059.
- Rastogi, S.C., Johansen, J.D. & Menné, T., 1996. Natural ingredients based cosmetics. *Contact Dermatitis*, 34, pp.423–426.
- Rodrigo, R., Miranda, A. & Vergara, L., 2011. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 412(5-6), pp.410–424.

- Rodriguez, G.A., 2001. Extraction , Isolation , and Purification of Carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, pp.1–8.
- RSC, 2014. ChemSpider - Search and share chemistry by Royal Society of Chemistry. Available at: www.chemspider.com [Accessed July 30, 2014].
- Sánchez-González, L. et al., 2011. Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), pp.1–16.
- Santos, J. et al., 2014. Phenolic profile evolution of different ready-to-eat baby-leaf vegetables during storage. *Journal of Chromatography. A*, 1327(2014), pp.118–131.
- Santos, J. et al., 2012. Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage. *Journal of Chromatography. A*, 1261, pp.179–188.
- Sasaki, Katsunori & Takahashi, T., 2002. A flavonoid from Brassica rapa flower as the UV-absorbing nectar guide. *Phytochemistry*, 61(3), pp.339–343.
- Scott, J., 2001. Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, pp.2.1–2.10.
- Serra, A.T. et al., 2013. Evaluation of Opuntia spp. derived products as antiproliferative agents in human colon cancer cell line (HT29). *Food Research International*, 54(1), pp.892–901.
- Serra, A.T., 2010. *Valorization of Traditional Portuguese Apples and Cherries Biochemical characterization and development of functional ingredients Valorization of Traditional Portuguese Apples and Cherries Biochemical characterization and Ana Teresa de Carvalho Negrão Ser.* Universidade Nova de Lisboa.
- Sesso, H.D. et al., 2003. Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women. *The Journal of Nutrition*, 133(7), pp.2336–2341.
- Shahidi, F., 2009. Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), pp.376–387.
- Shimokawa Ki, K. et al., 2002. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. *Molecular Human Reproduction*, 8(1), pp.32–36.
- Shirasugi, I. et al., 2010. Sulforaphane inhibited melanin synthesis by regulating tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(3), pp.579–582.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A.J., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American. Journal of Enology. Viticulture.*, 16, pp.144–158.
- Smith, E.N., 2007. *Watercress (Nasturtium officinale) Production Utilizing Brook Trout (Salvelinus fontinalis) Flow-trough Aquaculture Effluent*. West Virginia University.
- Sousa, C., 2009. *Perfil Metabólico E Potencial Antioxidante de BRASSICA OLERACEA VAR. COSTATA*. Universidade do Porto.
- Spense, R.-M. et al., 1983. Compounds associated with the surface lipid layer of Watercress. *Phytochemistry*, 22(8), pp.1753–1756.
- Stringheta, P.C. et al., 2006. LUTEÍNA : PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E BENEFÍCIOS À SAÚDE. *Alim. Nutr.*, 17(2), pp.229–237.

- Szczepiorkowski, Z. & Laposata, M., 2001. Fatty acid ethyl esters - toxic nonoxidative metabolites of ethanol. In D. Mostofsky, S. Yehuda, & N. Salem, eds. *Fatty Acids: Physiological and Behavioral Functions*. Totowa, N.J.: Humana Press Inc., p. 435.
- Tapiero, H., Townsend, D.M. & Tew, K.D., 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(2), pp.100–110.
- Tiveron, A.P., 2010. *Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil Piracicaba*. Universidade de São Paulo.
- Tsukamoto, C. et al., 1995. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds : Changes in Isoflavones , Saponins , and Composition of Fatty Acids at Different Temperatures during Seed Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, pp.1184–1192.
- Tubtimdee, C. & Shotipruk, A., 2011. Extraction of phenolics from *Terminalia chebula* Retz with water–ethanol and water–propylene glycol and sugaring-out concentration of extracts. *Separation and Purification Technology*, 77(3), pp.339–346.
- Uchbauer, G.E.B., 2002. Aroma Compound Analysis of *Eruca sativa* (Brassicaceae) SPME Headspace Leaf Samples Using GC , GC – MS , and Olfactometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 , pp.10–13.
- USDA, Basic Report: 11591, Watercress, raw - Nutrient values and weights are for edible portion. *National Nutrient Database for Standard Reference*, 26.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A. & Garcia-Viguera, C., 2002. Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(11), pp.1293–1297.
- Visse, R. & Nagase, H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92(8), pp.827–839.
- Yazdanparast, R., Bahrámikia, S. & Ardestani, A., 2008. *Nasturtium officinale* reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 172(3), pp.176–184.
- Zhang, H. et al., Plant terpenes. *Phytochemistry and Pharmacognosy*.

Anexos

Anexo I - Cinética para determinação do tempo de extracção

O tempo de extracção aplicado no DOE foi fixado após realização de uma cinética. Para tal foram realizadas extracções com 20 mL EtOH:H₂O a 20°C, 50°C e 80°C (três temperaturas testadas no DOE) com m = 5g de agrião fresco, agitação = 750 rpm, e em cada uma delas foram retirados pontos (200 µL) a t = 1h, t = 2h, t = 3h e t = 4 h. Estes pontos foram posteriormente caracterizados para determinação de polifenóis totais pelo método de Folin Ciocalteu (tabela a.1.). Os resultados foram apresentados graficamente (figura a.1.) o que permitiu a comparação entre os polifenóis obtidos, nas diferentes temperaturas e nos diferentes tempos de extracção. Verificou-se que o aumento da concentração de polifenóis não foi significativo ao longo do tempo, não justificando o prolongamento do tempo de extracção, e consequentes gastos energéticos, por mais de 1h. Deste modo fixou-se t = 1h.

Tabela a.1. – Valores de polifenóis totais pelo método de Folin Ciocalteu da cinética para determinação do tempo de extracção

Amostra	tempo (h)	Polifenóis totais (mg EAG/L)	DP	Polifenóis totais (mg EAG/g m.f.)	Média
T=20°C	1	234	3	0,94	0,95
		239	0	0,96	
	2	254	2	1,02	1,05
		269	1	1,08	
	3	272	1	1,09	1,11
		283	1	1,13	
	4	285	3	1,14	1,13
		281	1	1,12	
T=50°C	1	236	0	0,94	0,98
		256	4	1,02	
	2	248	4	0,99	1,05
		275	3	1,10	
	3	277	5	1,11	1,12
		285	4	1,14	
	4	291	2	1,17	1,18
		297	1	1,19	
T=80°C	1	243	1	0,97	1,03
		270	1	1,08	
	2	254	0	1,02	1,03
		263	11	1,05	
	3	281	4	1,13	1,13
		283	1	1,13	
	4	299	3	1,20	1,20
		300	3	1,20	

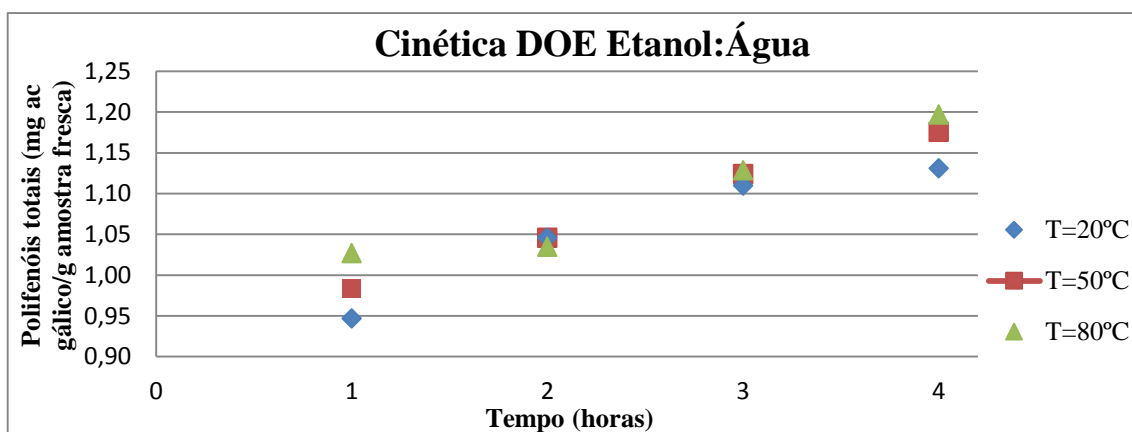


Figura a.1. – Representação gráfica dos valores de polifenóis totais da cinética para determinação do tempo de extracção

Anexo II – Design de Experiências (DOE)**Tabela a.2.** – Desenho de experiências Box B 3 factores, fornecido pelo *software*

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
	StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Razão água:co- solvente	Razão matriz: solvente	Temperatura
1	15	1	0	1	0,5	1:4	50
2	11	2	2	1	0,5	1:2	80
3	9	3	2	1	0,5	1:2	20
4	6	4	2	1	1	1:4	20
5	4	5	2	1	1	1:6	50
6	5	6	2	1	0	1:4	20
7	7	7	2	1	0	1:4	80
8	3	8	2	1	0	1:6	50
9	14	9	0	1	0,5	1:4	50
10	10	10	2	1	0,5	1:6	20
11	1	11	2	1	0	1:2	50
12	13	12	0	1	0,5	1:4	50
13	8	13	2	1	1	1:4	80
14	2	14	2	1	1	1:2	50
15	12	15	2	1	0,5	1:6	80

Anexo III – Optimização do Método Espectrofotométrico para Determinação de Terpenos Totais

Para a determinação espectrofotométrica de terpenos totais foi optimizada a metodologia descrita por Doneca-Sapceska et al. 2006. No original, a determinação era realizada para um total de 10 mL de amostra, sendo adaptada para $v = 1,2$ mL. Também a concentração da solução padrão Linalool:H₂O para a construção da curva de calibração foi modificada de 20 – 100 mg/L para 1,25 – 20 mg/L, para ser possível ler absorvâncias menores que 1, no espectrofotómetro. Só assim foi praticável a aplicação da lei de *Lambert-Beer*, que correlaciona a concentração com a absorvância. Na tabela a.3. e na figura a.2. é possível a tabela e o gráfico resultante, que comprovam a aplicação desta lei, no método optimizado, e que foi utilizado para o cálculo dos terpenos totais nos extractos. A gradação de cores (figura a.3.) no final da reacção da solução padrão com a solução vanilina:H₂SO₄, que está na base deste método, possibilita a denominação de método colorimétrico, ou seja, quanto maior for a concentração de linalool, maior é a absorvância, mais escura é a solução final.

Tabela a.3. – Concentrações da solução padrão (1,25 – 20 mg/L Linalool:H₂O) e respectivas absorvâncias

Concentração de Linalool (mg/L H ₂ O)	Absorvância
20	0,793
15	0,639
10	0,393
5	0,201
2,5	0,101
1,25	0,056
0	0

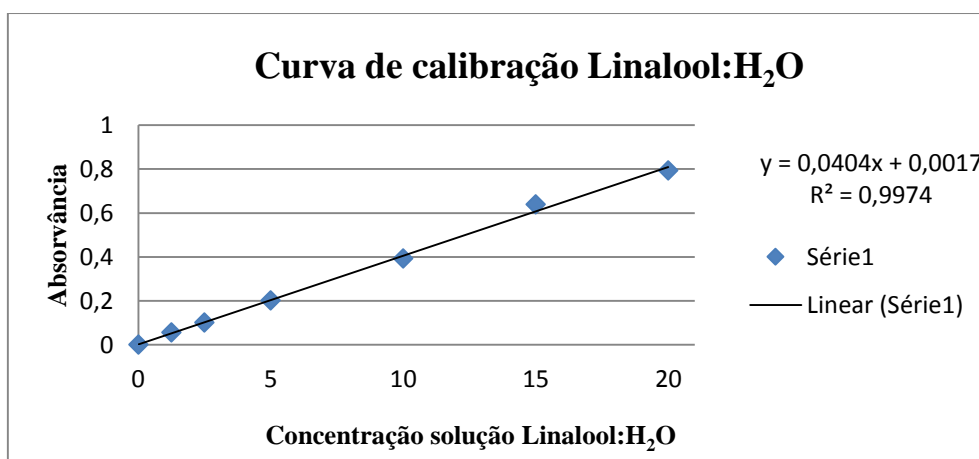


Figura a.2. – Representação gráfica da curva de calibração 1,25 – 20 mg/L Linalool:H₂O para determinação espectrofotométrica de Terpenos Totais

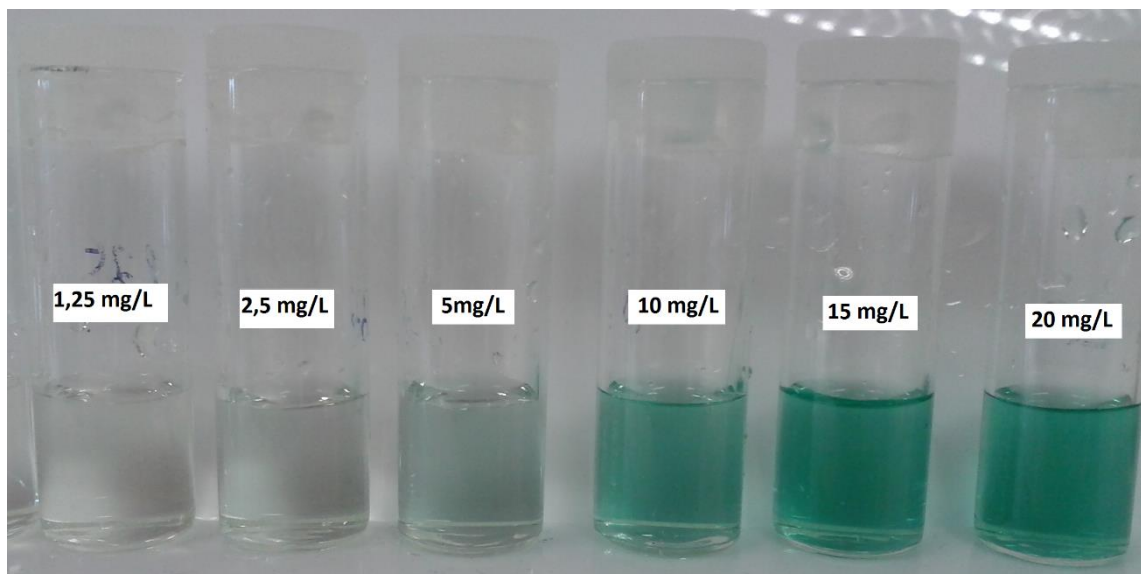


Figura a.3. – Representação da gradação de cores das soluções padrão utilizadas na construção da curva de calibração Linalool:H₂O para determinação espectrofotométrica de Terpenos Totais

Anexo IV – Determinação do Índices de Retenção

O cálculo dos índices de retenção foi realizado para possibilitar a validação das identificações da composição volátil da matriz agrião e dos extractos.

Após a análise dos padrões alcanos, os cromatogramas resultantes (figuras x) foram analisados facultando os tempos de eluição nas condições/ coluna de análise. Conhecendo esses dados (tabela x), foi construído um gráfico de dispersão. Os pontos obtidos foram ajustados recorrendo a uma regressão linear e a uma regressão polinomial de 2ª ordem (figura a.4.).

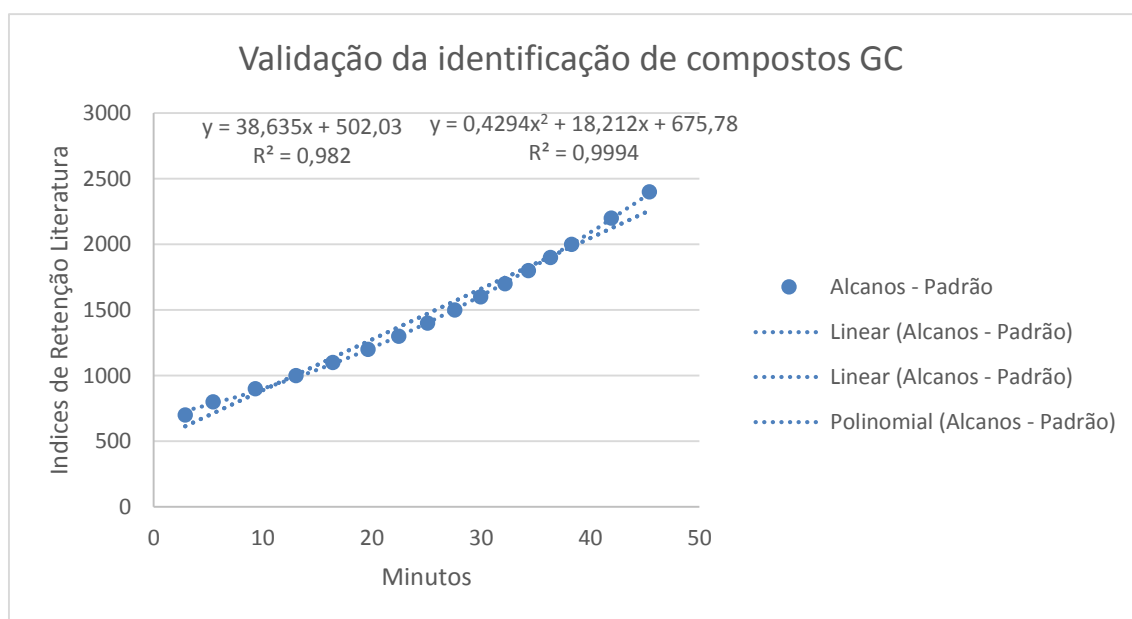


Figura a.4. – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial de 2ª ordem, realizados para os tempos de retenção da análise dos padrões (C7-C24) vs. índices de retenção da literatura

Pela análise do gráfico foi possível concluir que o comportamento de eluição dos padrões possuiu um R^2 superior para o ajuste polinomial de 2ª ordem, e consequentemente concluiu-se que a performance tempos de retenção na coluna factor Four vs. IR's dos padrões, não é linear. No entanto, apesar de não haver linearidade para o conjunto dos pontos apresentados, existe linearidade entre dois pontos consecutivos.

Deste modo, optou-se por calcular os IR dos compostos identificados utilizando interpolação linear entre os dois padrões, cujo tR de cada composto se situasse no intervalo de tR de dois padrões consecutivos.

Exemplificado: Cálculo de IR para n-Hexanal com tR = 5,64 min

Sabendo que C8 tem tR = 5,44 min e IR = 800 e C9 tem tR = 9,32 min e IR = 900 (Delta tR = 3,88 min e Delta IR = 100).

$$tR (\text{n-Hexanal}) - tR (\text{C8}) = 0,2$$

Se,

$$3,88 \text{ min} - - - - - 100$$

$$0,2 \text{ min} - - - - - x$$

$$\Leftrightarrow x = 5,155$$

$$\text{Logo, } IR = 800 + 5,155 \approx 805$$

Comparando com o valor fornecido pela literatura (IR = 801), foi calculado o erro relativo percentual:

$$ER (\%) = \frac{IR \text{ calculado} - IR \text{ literatura}}{m\acute{e}dia(IR \text{ calculado} - IR \text{ literatura})} \times 100 = 0,5 \%$$

Foram validadas identificações com erro menor ou igual 3%.

